

Strukturelle Untersuchung Histon-Deacetylase-ähnlicher Enzyme aus *Pseudomonas aeruginosa*

Vom Fachbereich Chemie
der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



TECHNISCHE
UNIVERSITÄT
DARMSTADT

genehmigte
Dissertation

vorgelegt von
Dipl. Chem. Andreas Krämer
aus Forbach

Referent:	Prof. Dr. Harald Kolmar
Korreferenten:	Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes (Hochschule Darmstadt) Prof. Dr. Wolfgang Sippl (Universität Halle-Wittenberg)
Tag der Einreichung:	14. Februar 2017
Tag der mündlichen Prüfung:	5. April 2017

Darmstadt 2017

D17

Publikationen

Große Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert, befinden sich derzeit in Revision, wurden eingereicht und auf Tagungen präsentiert.

Publiziert:

Krämer, A., Wagner, T., Yildiz, Ö., and Meyer-Almes, F.-J (2016)

Crystal Structure of a Histone Deacetylase Homologue from *Pseudomonas aeruginosa*

Biochemistry 55 (49), pp 6858–6868. DOI: 10.1021/acs.biochem.6b00613

Weston, C. E. *, Krämer, A.*, Colin, F., Yildiz, Ö., Baud, M. G. J., Meyer-Almes, F.-J. & Fuchter, M. J. (2016)

Toward Photopharmacological Antimicrobial Chemotherapy Using Photoswitchable Amidohydrolase Inhibitors

ACS Infectious Diseases. DOI: 10.1021/acsinfecdis.6b00148

Krämer, A., Herzer, J., Overhage, J., and Meyer-Almes, F.-J. (2016)

Substrate specificity and function of acetylpolyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa*

BMC Biochemistry 17, 4. DOI: 10.1186/s12858-016-0063-z

Meyners, C., Wawrzinek, R., Krämer, A., Hinz, S., Wessig, P., and Meyer-Almes, F. -J. (2014)

A fluorescence lifetime-based binding assay for acetylpolyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa* using a [1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxole (DBD) ligand probe

Analytical and bioanalytical chemistry 406, 4889-4897. DOI: 10.1007/s00216-014-7886-5

In Revision:

Meyners, C., Krämer, A., Yildiz, Ö., and Meyer-Almes, F.-J (2016)

The thermodynamic signature of ligand binding to histone deacetylase like amidohydrolases is most sensitive to the flexibility in the L2 loop lining the active site pocket

BBA General Subjects

*geteilte Erstautorschaft

Meyners, C., Kleinschek A., Wolf. B., Krämer, A., Meyer-Almes, F.-J (2017)

Perfluorated hydroxamic acids are potent and selective inhibitors of acetylpolyamine-amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa*

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

Publikationen zu anderen Themen während der Dr. Arbeit:

Zindel, S., Ehret, V., Ehret, M., Hentschel, M., Witt, S., Krämer, A., Fiebig, D., Juttner, N., Frols, S., Pfeifer, F. & Fuchsbauer, H. L. (2016)

Involvement of a Novel Class C Beta-Lactamase in the Transglutaminase Mediated Cross-Linking Cascade of *Streptomyces mobaraensis* DSM 40847

PLoS One 11, e0149145. DOI: 10.1371/journal.pone.0149145

Frick, E., Spatzal, T., Gerhardt, S., Krämer, A., Einsle, O. & Huttel, W. (2014)

Structural and functional characterization of 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase from the thermoacidophilic archaeon *Picrophilus torridus*

Extremophiles 18, 641-51. DOI: 10.1007/s00792-014-0645-x

Posterbeiträge:

A. Krämer, J. Carrera-Casanova, T. Wagner, Ö. Yildiz, F.J. Meyer-Almes

Crystal structure of a Class IIb Histone Deacetylase Homologue from *Pseudomonas aeruginosa*

Biophysical Society on the 10th European Biophysics Congress in Dresden 2015

Gewinner Poster Preis

**“What can be asserted
without evidence can be dismissed
without evidence”**

Christopher Hitchens
(1949- 2011)

Abstract (english)

The present thesis characterizes the enzymes PA0321, PA1409, and PA3774 from the human pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. All are members of the **histone deacetylase** (HDAC) superfamily and have been predicted to be putative **acetyl**polyamine-**amido**hydrolases (APAHs). Notably, an inhibition of these enzymes has been suggested as a potential remedy against *P. aeruginosa* infections. The main focus of the thesis was to solve the enzymes' structures by X-ray crystallography in order to develop specific and potent inhibitors.

Enzymatic analyses revealed that only PA0321 and PA1409 were actual APAHs, whereas PA3774 showed no significant turnover rates for acetylated polyamines. However, the high activity of this enzyme for artificial histone deacetylase substrates suggests that the native substrates are acetylated proteins. The structure of the protein PA3774 was solved at atomic resolution. Apart from the native enzyme, other ligand-enzymes-complexes were determined that provided detailed insights into particular ligand interactions. The structure of this protein was found to be homolog to an enzyme called **histone deacetylase-like amido**hydrolase (FB188-HDAH) from *Bordetella/Alcaligenes*, suggesting that PA3774 should be classified as a HDAH rather than an APAH. For a better understanding and comparison of PA3774 and FB188-HDAH, the crystallization of the FB188-HDAH was reproduced and novel inhibitor-enzymes complexes were determined. A closer investigation revealed an unusually elongated L1-Loop to be responsible for a unique tetramerization in both enzymes with direct influence on the entrance tunnel to the enzyme's catalytic center. This then lead to the hypothesis that the assembly is crucial for substrate recognition and selectivity. Moreover, the biological assembly is strikingly different in comparison to the APAH from *M. ramosa*, an enzyme that is closely related to PA1409 and PA0321. The distinct structural differences between HDAH and APAH enzymes thus provide a plausible explanation for their diverging substrate selectivities.

In addition, two side projects were conducted. In the first one, a new fluorescence lifetime binding assay was developed. The assay is suitable for high throughput screening applications as well as to determine binding constants of inhibitors.

The second side project tested photo-switchable inhibitors on bacterial and human HDACs with promising results. In some cases the inhibition of the metastable *cis*-state was up to 10 times stronger than the thermostable *trans*-state. Given the fact that human HDACs are known targets in cancer treatment, such inhibitors may ultimately lead chemo therapies with fewer side-effects.

Abstract (deutsch)

In der vorliegenden Arbeit wurden die drei Enzyme PA0321, PA1409 und PA3774 aus dem Humanpathogen *Pseudomonas aeruginosa* untersucht. Alle drei Enzyme gehören zur Histon-Deacetylase-Superfamilie (HDAC) und waren anhand von Sequenzanalysen als putative Acetylpolyamin-Aminohydrolasen (APAH) vorhergesagt. Das Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der strukturellen Aufklärung dieser Enzyme mithilfe der Kristallstrukturanalyse. Die daraus gewonnenen Informationen, sollten dazu dienen potente und selektive Inhibitoren zu entwickeln, da angenommen wurde, dass eine Inhibition dieser Enzyme dazu beitragen könnte, bakterielle Infektion besser zu bekämpfen.

Eine enzymatische Analyse der Enzyme bestätigte die Vorhersage, dass es sich bei den Enzymen PA1409 und PA0321 um APAHs handelt. Im Gegensatz dazu zeigte das Enzym PA3774 keinen signifikanten Umsatz von acetylierten Polyaminen. Die hohen Umsatzraten von artifiziellen HDAC-Substraten lassen darauf schließen, dass acetylierte Proteine die eigentlichen Substrate dieses Enzyms sind. Im weiteren Verlauf gelang es die Struktur des Enzyms PA3774 aufzuklären. Neben der nativen Struktur konnten zusätzlich Enzym-Ligand-Komplexe in hoher Auflösung determiniert werden, die detaillierte Einblicke in das Bindungsverhalten der Liganden geben. Wie sich herausstellte, zeigt PA3774 eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit der Histon-Deacetylase-ähnlichen Amidohydrolase (FB188-HDAH) aus *Bordetella/Alcaligenes* und sollte treffender als HDAH anstatt als APAH klassifiziert werden. Zum besseren Verständnis und Vergleich dieser beiden Proteine wurde die Kristallisation der FB188-HDAH reproduziert und es konnten verschiedene neue Enzym-Ligand-Komplexe erhalten werden. Beide Enzyme zeigen eine analoge Tetramerisierung, deren spezifische Assemblierung den Bindungskanal entscheidend beeinflusst. Aufgrund dessen ist anzunehmen, dass diese Quartärstruktur eine essenzielle Funktion besitzt. Zwar gelang die Kristallisation von PA0321 und PA1409 im Rahmen dieser Arbeit nicht, jedoch ist die Struktur der eng verwandten APAH aus *M. ramosa* bereits bekannt. Ein Vergleich der HDAH und APAH Enzyme zeigt gravierende Unterschiede hinsichtlich ihrer Quartärstruktur, was eine plausible Erklärung für ihre unterschiedlichen Substratspezifitäten liefert. Zusätzlich wurden an zwei Nebenprojekten gearbeitet. Im Ersten wurden vielversprechende photoschaltbare Inhibitoren auf bakterielle sowie menschliche HDAC-Enzyme untersucht. Hierbei zeigten die Inhibitoren in ihrer metastabilen *cis*-Konfiguration eine um bis zu 10-fach erhöhte Wirkung Inhibition im Vergleich zur thermostabileren *trans*-Konfiguration. Solche photoschaltbaren Inhibitoren eröffnen einen Weg hin zu zielgerichteten nebenwirkungsärmeren Chemotherapien. In einem weiteren Nebenprojekt wurde ein neuartiger Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assay entwickelt, der es ermöglicht im Hochdurchsatzverfahren große Substanzbibliotheken zu testen und Inhibitoren für diese Enzymklasse zu finden. Darüber hinaus können Bindungskonstanten von Inhibitoren unabhängig von der Enzymaktivität bestimmt werden.

1. EINLEITUNG.....	1
1.1. Histon-Deacetylase-Superfamilie	1
1.1.1. Einteilung.....	1
1.1.2. Funktion und Bedeutung.....	1
1.1.3. Struktureller Aufbau.....	2
1.1.4. Mechanismus.....	3
1.2. Polyamine	5
1.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
1.3.1. Einteilung und Pathogenität.....	6
1.4. Photoschaltbare Verbindungen.....	7
1.4.1. Grundlagen	7
1.4.2. Potenzielle Einsatzmöglichkeiten	8
1.5. Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assay.....	10
1.5.1. Assay-Prinzip (physikalische Grundlagen)	10
1.5.2. Anforderungen an einen effizienten Assay	11
1.6. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen.....	12
1.6.1. Kristallisation	12
1.6.2. Röntgenbeugung	13
1.7. Fragestellung und Zielsetzung	16
2. MATERIALIEN	18
2.1. Chemikalien.....	18
2.2. Kits	18
2.3. Bakterienstämme.....	18
2.4. Proteine und Marker.....	19
2.5. Kristallisation Screens	19
2.6. Gene und Vektoren	20
2.7. Oligonukleotide (Primer).....	20
2.8. Puffer, Lösungen und Medien	21

2.9.	Reinigungs- und Analytik-Säulen.....	23
2.10.	Geräte.....	24
2.11.	Verbrauchsmaterialien	25
3.	METHODEN.....	26
3.1.	Molekularbiologische Methoden.....	26
3.1.1.	Expression und Isolierung von Plasmid-DNA	26
3.1.2.	Agarose-Gelelektrophorese.....	26
3.1.3.	Klonierung und Ligation von Plasmid-DNA.....	27
3.1.4.	Konzentrationsbestimmung von DNA	27
3.1.5.	Hitzeschock-Transformation.....	28
3.1.6.	Ortspezifische Mutagenese	28
3.1.7.	DNA-Sequenzierung	29
3.2.	Mikrobiologische Methoden.....	30
3.2.1.	Glycerindauerkultur	30
3.2.2.	Submerskultivierung von <i>E. coli</i> und Proteinexpression.....	30
3.2.3.	Zellernte	30
3.2.4.	Zellaufschluss	30
3.3.	Proteinchemische Methoden.....	31
3.3.1.	Affinitätschromatographie.....	31
3.3.2.	Größenausschlusschromatographie.....	32
3.3.3.	Konzentration von Proteinlösungen	33
3.4.	Proteinanalytische Methoden	33
3.4.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch BCA-Assay	33
3.4.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
3.4.3.	Coomassieblau-Färbung von Proteinen auf SDS Gelen	34
3.4.4.	Aktivitätsbestimmung mittels AMC-Assay	35
3.4.5.	Aktivitätsbestimmung mittels modifizierten Diaminoxidase-Assay	37
3.4.6.	Aktivitätsbestimmung mittels Acetat-Assay	39
3.4.7.	Aktivitätsbestimmung mittels Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays.....	40
3.5.	Kristallographische Methoden	42
3.5.1.	Durchführung der Proteinkristallisation.....	42
3.5.2.	Datensammlung am Synchrotron.....	43
3.5.3.	Strukturlösung, Verfeinerung und Visualisierung	43

4. ERGEBNISSE	44
4.1. Gentechnische Arbeiten	44
4.1.1. Umklonierung des Gens <i>pa0321</i>	44
4.1.2. Rückmutation des Gens <i>pa1409</i>	45
4.1.3. Mutationsstudie am Enzym PA3774	46
4.2. Proteinreinigungen	47
4.2.1. Reinigung des Enzyms PA3774 und dessen Mutanten	47
4.2.2. Reinigung des Enzyms PA0321	49
4.2.3. Reinigung des Enzyms PA1409	50
4.2.4. Reinigung der FB188-HDAH	51
4.2.5. Reinigung der Acetyl-CoA-Synthetase	52
4.3. Untersuchungen der Enzymkinetik mittels verschiedener Assays	54
4.3.1. Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter durch AMC-Assay	54
4.3.2. Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter durch Diaminoxidase-Assay	56
4.3.3. Halbqualitativer Nachweis des Acetylpolyamin-Umsatzes mittels Acetat-Assay	57
4.4. IC₅₀-Bestimmungen photoschaltbarer Inhibitoren auf die HDAC-Familie	58
4.4.1. IC ₅₀ -Bestimmungen der Arylazopyrazol-Derivate auf bakterielle HDACs	59
4.4.2. IC ₅₀ -Bestimmungen der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDACs	60
4.4.3. IC ₅₀ -Bestimmungen der Azobenzol-Derivate auf bakterielle HDACs	62
4.4.4. IC ₅₀ -Bestimmungen der Azobenzol-Derivate auf menschliche HDACs	64
4.5. Entwicklung eines Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays	66
4.5.1. Bestimmung der FLT Parameter und optimalen Proteinmenge	66
4.5.2. Bestimmung der inhibitorischen Konstante durch FLT-Assay	67
4.6. Kristallisationsversuche	69
4.6.1. Kristallisation des Enzyms PA3774	69
4.6.2. Kristallisation des Enzyms FB188-HDAH	71
4.7. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung	73
4.7.1. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung des Enzyms PA3774	73
4.7.2. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung des Enzyms FB188-HDAH	76
4.8. Strukturbeschreibung des Enzyms PA3774	79
4.8.1. Beschreibung der asymmetrischen Einheit	79
4.8.2. Beschreibung der Einheitszelle	80
4.8.3. Tetramerisierung hat entscheidenden Einfluss auf das Aktivzentrum	81
4.8.4. Beschreibung der Metallbindestellen	83

4.9. Bindung von Liganden an das Enzym PA3774	84
4.9.1. Ligandenfreie Struktur	84
4.9.2. Bindung des Inhibitors SATFMK	85
4.9.3. Bindung des Inhibitors CEW395	86
4.9.4. Bindung des Reaktionsproduktes Acetat	87
4.9.5. Ligandenfreie PA3774-Mutanten.....	88
4.9.6. Bindung des Inhibitors PFSAHA an die Mutante PA3774 _{Y313F}	89
4.10. Strukturbeschreibung des Enzyms FB188-HDAH und Vergleich mit PA3774	90
4.11. Bindung von Liganden an das Enzym FB188-HDAH	91
4.11.1. Bindung des Inhibitors PFSAHA	91
4.11.2. Bindung des Inhibitors SATFMK an die Mutante FB188-HDAH _{T101A}	92
4.11.3. Bindung der photoschaltbaren Inhibitoren.....	94
4.11.4. Bindung des Inhibitors PD 404,182.....	95
4.12. Strukturelle Änderungen durch Ligandenbindung bei FB188-HDAH und PA3774	97
5. DISKUSSION	99
5.1. Vergleich mit anderen Vertretern der HDAC-Superfamilie	99
5.1.1. Multiples Sequenzalignment und Einordnung	99
5.1.2. Strukturelle Unterschiede zwischen HDAHs und APAHs.....	100
5.2. Biologische Funktion der drei HDAC-ähnlichen Enzyme aus <i>P. aeruginosa</i>.....	102
5.2.1. PA0321 und PA1409 sind Acetylpolymamin-Amidohydrolasen	102
5.2.2. PA3774 ist eine Histon-Deacetylase-ähnliche Amidohydrolase	103
5.2.3. Mögliche Gründe für zwei APAH-Isoformen in <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	104
5.3. Rückschlüsse auf den Mechanismus anhand von Mutationsstudien an PA3774	105
5.4. Beurteilung der photoschaltbaren Inhibitoren.....	108
5.5. Beurteilung des Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays	110
6. FAZIT	112
7. LITERATURVERZEICHNIS	115
8. ANHANG	123
8.1. Optimierte Feinscreens für Protein Kristallzucht	123
8.2. Inhibitoren.....	125

8.3. Abbildungsverzeichnis	126
8.4. Tabellenverzeichnis	127
8.5. Abkürzungsverzeichnis	128
9. DANKSAGUNG	130
10. ERKLÄRUNGEN	131
11. LEBENSLAUF	133
12. DATEN DVD.....	Hardcover Innenseite

Beinhaltet:

- Publikationen & Poster
- PDB-Dateien mit zugehörigen Elektronendichtekarten
- IC₅₀-Bestimmungen (photoschaltbare Inhibitoren)
- Michaelis-Menten-Kinetiken (AMC-Assay und Diamin-Oxidase-Assay)
- Daten Acetats-Assay
- Vektorkonstrukte der beschriebenen Enzyme
- MALLS-Experiment
- Daten des FLT-Assays

1. EINLEITUNG

1.1. Histon-Deacetylase-Superfamilie

1.1.1. Einteilung

Histon-Deacetylasen (HDACs), Acetylamin-Amidohydrolasen (AAHs) und Acetoin-Utilization Proteine (AUPs) gehören zu einer evolutionär alten Proteinklasse, die unter dem Namen Histon-Deacetylase-Superfamilie zusammengefasst wird¹. In eukaryotischen Organismen gibt es mehrere HDAC-Isoformen, die sich in Abhängigkeit ihrer Sequenz und Funktion in die Klassen I, II, III und IV unterteilen. Dabei stellen die Klassen I, II und IV „klassische“ Zink-abhängige HDACs dar, wohingegen Klasse III eine atypische Klasse ist, die NAD^+ als Cofactor benötigt. Alternativ wird diese Klasse als Sirtuine bezeichnet². In Prokaryoten finden sich ebenfalls HDAC-ähnliche Proteine und es wird vermutet, dass diese zusammen mit den AAHs und AUPs die evolutionären Vorgänger der eukaryotischen HDACs verkörpern¹.

1.1.2. Funktion und Bedeutung

- HDAC

HDACs entfernen Acetylgruppen von acetylierten Lysin-Seitenketten am N-terminalen Histonende (Abbildung 1A), was diesen Enzymen ursprünglich ihren Namen gab. Durch die Deacetylierung erhält das betreffende Lysin eine positive Ladung, wodurch die Affinität des Histons zum negativ geladenen Phosphatrückgrat der DNA erhöht wird³ (Abbildung 1B). Infolgedessen können Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden und die Genexpression wird herab reguliert. Zusammen mit ihren Gegenspielern den Histon-Acetyltransferasen (HATs) nehmen diese Enzyme eine zentrale Rolle in der Epigenetik ein⁴. In diesem Zusammenhang wurden HDACs für die Krebsforschung interessante Targets, da in entartenden Tumorzellen die Genexpression unreguliert verläuft. Diese Forschung führte bereits zu zugelassen HDAC-Inhibitoren wie SAHA (Voronostat), Entinostat, Romidepsin (Istodax), Belinostat (Beleodaq), Chidamide (Epidaza) oder Panobinostat (Farydak)⁵. Der genaue Wirkmechanismus dieser Inhibitoren ist nicht vollständig verstanden. Es wird angenommen, dass durch die daraus veränderte Genexpression die Apoptose angeregt wird^{6, 7}. Des Weiteren führen diese Chemotherapeutika zu einer Hyperacetylierung des Proteins p53, was ebenfalls in einer Apoptose dieser Zellen resultiert^{8, 9}.

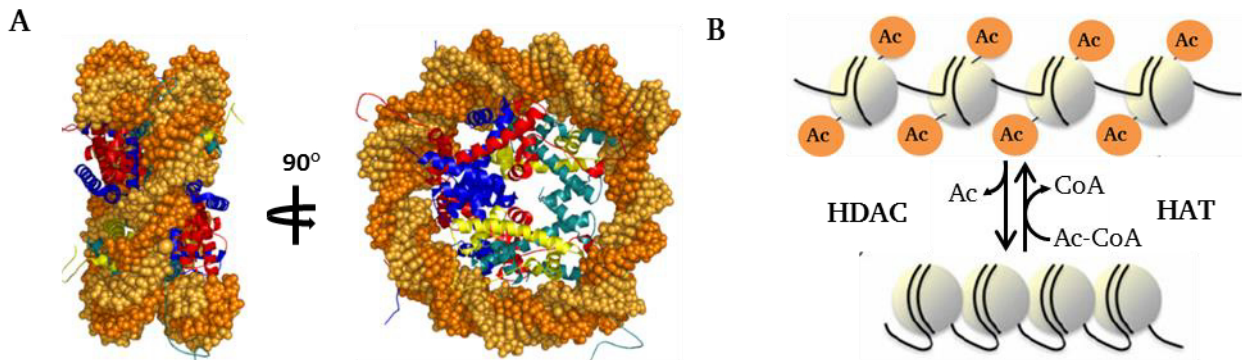


Abbildung 1: Histon-Oktamer mit gebundener DNA. (A) zeigt ein Histon-Oktamer (PDB 1EQZ)¹⁰ in der Seitenansicht sowie Draufsicht. Es wird durch je zwei Monomere H2A (rot), H2B (blau), H3 (türkis) und H4 (gelb) gebildet. Die DNA (orange/gelb) windet sich ca. zweimal um das Oktamer. (B) zeigt schematisch die Wechselwirkung zwischen HDACs und HATs. Nicht-acetylierte Histone zeigen erhöhte Affinität zum negativ geladenen Rückgrat der DNA, was eine Repression der Genexpression zur Folge hat.

In jüngerer Zeit wurde deutlich, dass auch viele Nicht-Histon-Proteine wie beispielweise Hsp90¹¹ oder Tubulin¹² Substrate für diese Enzyme sind. Diese Nicht-Chromatin-Funktion der HDACs ist Bestandteil derzeitiger Forschung und das Wissen um neue Substrate und Bindungspartner wird fortwährend erweitert. Vor diesem Hintergrund werden HDACs alternativ auch als Lysin-Deacetylasen (KDACs) bezeichnet.

- APAH und ACU Proteine

APAHs werden hauptsächlich in Bakterien und Archaeen gefunden und nur selten in Eukaryoten¹. Sie katalysieren die Deacetylierung von Acetylpolyaminen. Die Substrate der ACU Proteine sind bisher nicht bekannt, es wurde allerdings beobachtet, dass ein *Knock-out* dieses Enzyms in *B. subtilis* in einem verminderten Wachstum dieses Bakterium auf Acetoin und Butandiol resultiert¹³. Acetoin ist ein Fermentationsprodukt vieler Bakterien, welches durch den Butandiol-Zyklus zu Acetat konvertiert werden kann, falls andere Kohlenstoffquellen nicht verfügbar sind¹⁴.

1.1.3. Struktureller Aufbau

Der strukturelle Aufbau eukaryotischer sowie prokaryotischer HDACs zeigt eine hohe Übereinstimmung in Bezug auf Faltung der Kerndomäne sowie Aufbau des katalytischen Zentrums¹ (Abbildung 2). Größere Unterschiede finden sich hauptsächlich in Loop-Regionen. Diese können speziell bei menschlichen HDACs sehr flexibel sein und dienen vorherrschend der Assoziation mit anderen Untereinheiten innerhalb von großen Multienzymkomplexen⁴. Aus diesem Grund mussten, in bisher veröffentlichten Strukturen, diese flexiblen Loop-Regionen teilweise entfernt werden, um eine Kristallisation zu ermöglichen^{15, 16}.

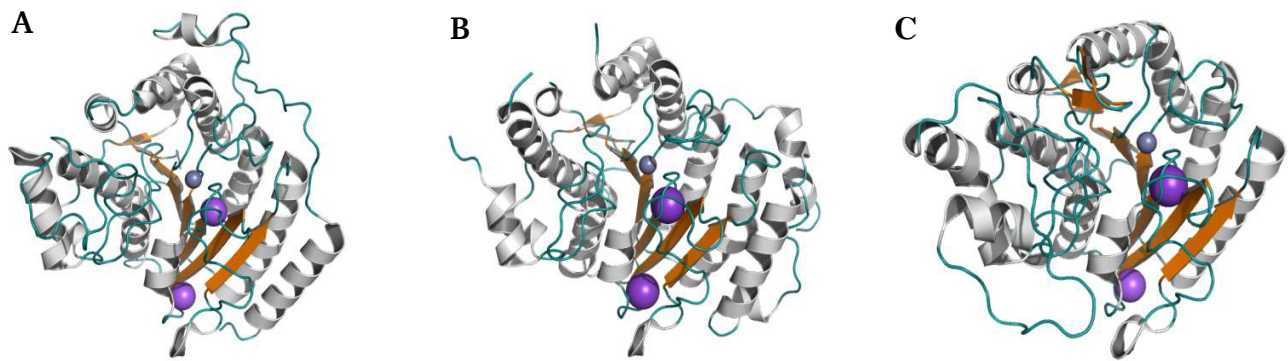


Abbildung 2: Vergleich verschiedener HDAC-Isoenzyme. Die Abbildung illustriert die hohe Ähnlichkeit der verschiedenen HDAC-Isoformen. **(A)** HDAC8 (PDB 1T64) als Vertreter der Klasse I. **(B)** Die Kerndomäne von HDAC4 (PDB 2VQV) als Vertreter der Klasse IIa **(C)** Die APAH (PDB 4ZUM) aus *M. ramosa*. Alle Strukturen nehmen eine offene α/β -Faltung an, bestehend aus acht zentral parallel angeordneten β -Faltblättern (orange), die von mehreren Helices umringt werden (grau). Im katalytischen Zentrum findet sich bei allen Isoformen ein konserviertes Zinkion (blau), daneben gibt es zusätzlich zwei monovalente Kation-Bindestellen, die meist mit Kaliumionen, teilweise aber auch mit Natriumionen besetzt sind (lila).

1.1.4. Mechanismus

Die Deacetylierung findet am zentralen Zinkion statt. Dieses wird bei allen HDAC-Isoformen durch ein Histidin und zwei Aspartate koordiniert. Daneben finden sich zwei hochkonservierte Histidine sowie ein Tyrosin, welche an der Hydrolyse der Amidbindung beteiligt sind. Eine Ausnahme bildet allerdings die Klasse IIa, bei der das Tyrosin gegen ein Histidin ausgetauscht ist.

Derzeit werden zwei verschiedene Mechanismen für die Deacetylierung diskutiert (Abbildung 3). Der Erste ist ein klassischer „Säure-Base-Paar“-Mechanismus und wurde ursprünglich von Finnin *et al.* auf Basis von Mutationsstudien am Histon-Deacetylase-like Protein (HDLP) aus *A. aeolicus* vorgeschlagen¹⁷. Hier übernimmt das innere Histidin die Funktion einer Base und das äußere Histidin die Funktion einer Säure (Abbildung 3A). Von Corminboeuf wurde anhand von DFT QM/MM Rechnungen und ebenfalls auf der Grundlage von HDLP hingegen ein „proton-shuttle“-Mechanismus vorgeschlagen¹⁸ (Abbildung 3B). Hier fungiert das äußere Histidin als Base und Säure, während das innere Histidin als elektrostatischer Katalysator hilft, das angreifende Wasser zu aktivieren. Das Tyrosin stabilisiert in beiden Mechanismen den tetraedrischen Übergangszustand. Spätere Born-Oppenheimer *ab-initio* QM/MM molekularer-Dynamik-Simulationen auf Basis der Struktur von HDAC8 von Wu *et al.*¹⁹ sowie umfassende Mutationsstudien von Gantt *et al.*²⁰ favorisieren ebenfalls diesen Mechanismus. Dem gegenüber stehen allerdings QM/MM Rechnungen von Chen *et al.*²¹, die wiederum den ursprünglichen Mechanismus propagieren. In Abbildung 3 sind die beiden Mechanismen gegenübergestellt.

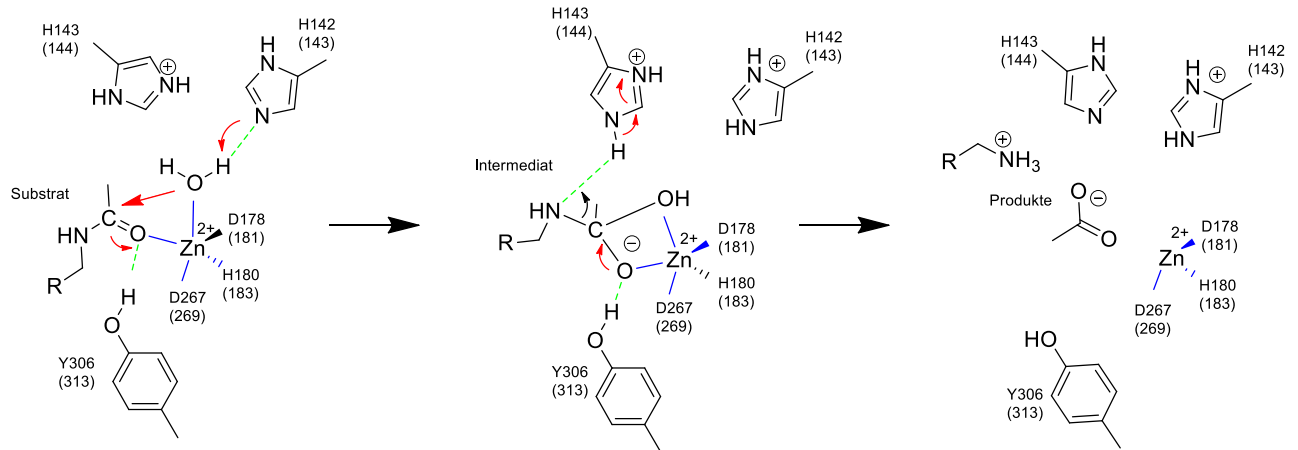
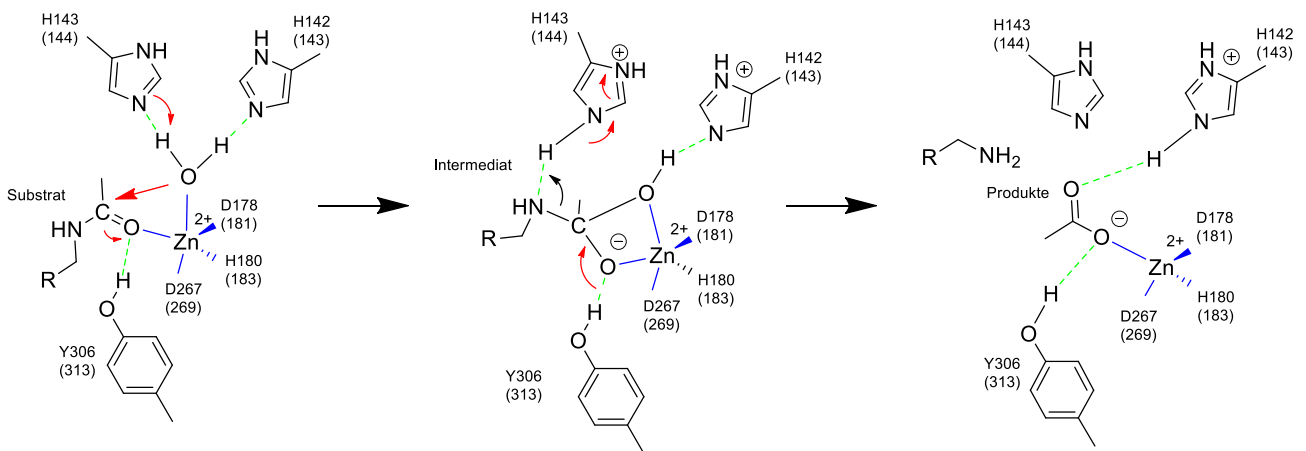
A**B**

Abbildung 3: Vorgeschlagene Mechanismen für HDACs der Klassen I, IIb und IV. (A) „Säure-Base-Paar“-Mechanismus (B) „proton-shuttle“-Mechanismus. Die Abbildung ist abgeleitet von Wu *et al.*¹⁹. Die Nummerierung der Aminosäuren bezieht sich auf HDAC8, die Zahlen in Klammern beziehen sich auf das Enzym PA3774. Grün gepunktete Linien kennzeichnen Wasserstoffbrücken, blaue Metallkoordination.

1.2. Polyamine

Polyamine sind kleine positiv geladene Moleküle, die in nahezu allen Organismen in millimolarer Konzentration vorkommen²². Die häufigsten biogenen Polyamine sind Putrescin, Cadaverin, Spermidin und Spermin²³ (Abbildung 4). Trotz ihres ubiquitären Vorkommens ist ihre genaue Funktion nicht im Detail verstanden. Dies ist teilweise darauf zurückzuführen, dass sie durch ihre kationischen Eigenschaften eine Vielzahl von potenziellen Bindungspartnern aufweisen. Sie wurden bereits assoziiert an prokaryotischer, eukaryotischer und viraler DNA oder RNA gefunden, da sie aufgrund ihrer positiven Ladung mit dem negativen Phosphatrückgrat interagieren können²⁴. In diesem Zusammenhang wird ihnen ebenfalls eine wichtige Rolle bei zellulären Prozessen wie Apoptose, Zelldifferenzierung, Zellzyklus Regulation und posttranslationaler Modifikation zugeschrieben²². Darüber hinaus stabilisieren sie die Zellmembran und sind essenziell für das Zellwachstum²⁵. Auf oxidativen Stress reagieren Zellen mit einer Erhöhung des Polyaminspiegels²⁶. Bei Prokaryoten stehen sie mit der Ausbildung von Biofilmen²⁷⁻²⁹ sowie der Entwicklung antibiotischer Resistenzen in Verbindung³⁰⁻³². In diesem Kontext werden Polyamine, ihre Biosynthese sowie ihre Transportsysteme als mögliche Virulenzfaktoren in menschlichen Pathogenen diskutiert³³⁻³⁵.

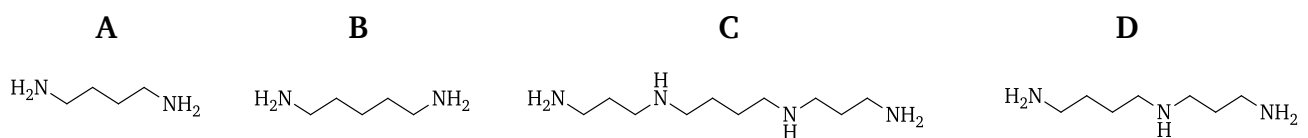


Abbildung 4: Strukturen der vier häufigsten biogenen Polyamine. (A) Putrescin (B) Cadaverin (C) Spermidin (D) Spermin.

1.3. *Pseudomonas aeruginosa*

1.3.1. Einteilung und Pathogenität

Pseudomonas aeruginosa ist ein stäbchenförmiges, 2-4 μm großes, ubiquitär vorkommendes, gram-negatives Bakterium. Mit ca. 6,3 Mbp und 5570 Genen gehört es mit zu den größten bisher sequenzierte Bakteriengenome³⁶.

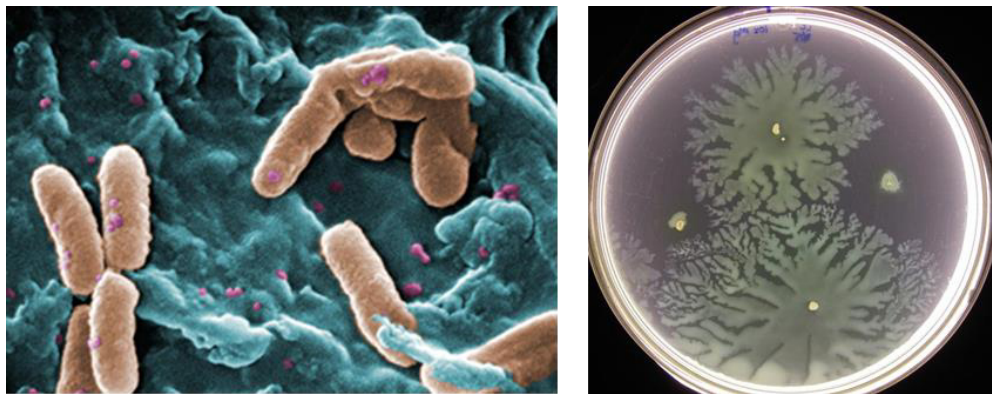


Abbildung 5: Aufnahmen von *Pseudomonas aeruginosa*. (Links) Raster-Scanning-Mikroskop Aufnahme einzelner Bakterien (Urheber Haney Carr, CDC). (Rechts) *P.a.* Kolonie auf Nährmedium (Foto Joshua Shrout, Universität Notre Dame). Aufgrund der grünen Farbe gelangte der Prokaryot zu seinem Namen (*lat. aerugo* = Grünspan).

Durch sein großes Genom ist der Prokaryot in der Lage sich in vielen Lebensräumen mit teils widrigen Bedingungen und verschiedenen Nahrungsquellen anzupassen³⁷. Für gesunde Menschen ist er meist ungefährlich, kann aber Menschen mit geschwächtem Immunsystem gefährlich werden. Da er unter anderem im Trinkwasser vorkommt, gelangt *P. aeruginosa* als Erreger in Krankenhäuser³⁸. Durch seine Multiresistenz gegenüber zahlreichen Antibiotika findet er hier nahezu optimale Bedingungen, da gewöhnliche Nahrungskonkurrenten weitestgehend eliminiert sind³⁹. Die Multiresistenz erlangt der Keim einerseits durch effiziente Exozytosesysteme und andererseits durch die Formierung von Biofilmen, mit denen er sich vor schädlichen Umwelteinflüssen abschirmen kann^{40, 41}. Darüber hinaus können in diesen Biofilmen, durch horizontalen Gentransfer, Resistenzgene mit anderen Bakterien ausgetauscht werden⁴². Diese Biofilme können sich beispielsweise an Beatmungsgeräten, Kathetern und anderen technischen Geräten ansiedeln und von dort aus den in den Organismus eindringen und ihn infizieren³⁸. Diese Eigenschaften machen *P. aeruginosa* heute zu einem der bedeutendsten Krankenhauskeime, auf den ca. 10 % aller Krankenhausneuinfektionen zurückzuführen sind⁴¹. Diverse Krankheiten und Verletzungen wie Cystische Fibrose^{43, 44}, Endokarditis⁴⁵, chronische Wunden^{46, 47} und Osteomyelitis³⁸, werden mit diesem Keim in Verbindung gebracht. Er dient heute daher als Modellorganismus zu Untersuchung antibiotischer Resistenzen^{40, 48}.

1.4. Photoschaltbare Verbindungen

1.4.1. Grundlagen

Unter photoschaltbaren Verbindungen werden Substanzen definiert, die durch Absorption elektromagnetischer Strahlung geeigneter Wellenlänge (λ) in eine andere Konfiguration überführt werden können. Da dies mit einer Änderung des Absorptionsspektrums einhergeht, werden solche Stoffe historisch auch als photochromatische Verbindungen bezeichnet⁴⁹. Ein bekannter Vertreter solcher Verbindungen ist das Azobenzol, welches reversibel zwischen seiner *cis*- und *trans*-Konfiguration geschaltet werden kann. Im Normalfall ist die *trans*-Konfiguration die thermodynamisch stabilere Konfiguration, während die *cis*-Konfiguration einen metastabilen Zustand darstellt⁵⁰. Durch Aufnahme eines Photons kann das *trans*-Isomer in das *cis*-Isomer überführt werden. Die Rückreaktion erfolgt erneut durch Aufnahme eines Photons längerer Wellenlänge oder durch thermische Relaxation (Abbildung 6)⁵⁰.

In der Praxis können allerdings nicht alle Moleküle vollständig in den metastabilen Zustand überführt werden. Das sich nach theoretisch unendlicher langer Bestrahlungszeit einstellende Gleichgewicht wird als photostationärer Zustand bezeichnet²³. Die Lage dieses Gleichgewichtes ist von verschiedenen Faktoren wie Lösungsmittel, Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, elektromagnetischer Felder sowie dem molekularen Aufbau des Moleküls abhängig⁵¹⁻⁵³. Die Verweildauer im metastabilen Zustand kann je nach Verbindung und Umgebung, zwischen wenigen Millisekunden⁵⁴ bis hin zu Tagen variieren⁵⁵.

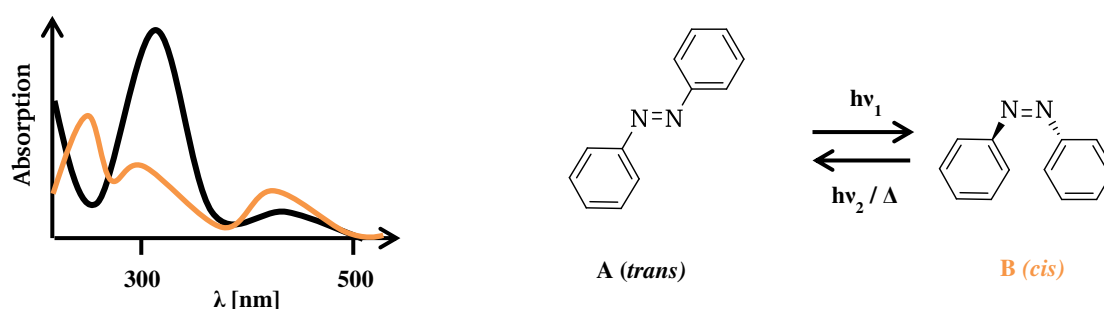


Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Photoisomerisierung. Die thermodynamisch stabilere *trans*-Konfiguration des Azobenzols wird durch Aufnahme eines Photons ($h\nu_1$) geeigneter Wellenlänge in die *cis*-Konfiguration überführt, wodurch sich das Absorptionsspektrum ändert (schwarz = *trans*, orange = *cis*). Die Rückreaktion aus diesem metastabilen Zustand erfolgt entweder durch Aufnahme eines Photons ($h\nu_2$) oder durch thermische Relaxation (Δ). Das abgebildete Spektrum wurde abstrahiert nach Wagner *et al.*⁵⁶.

1.4.2. Potenzielle Einsatzmöglichkeiten

Neben der Radiotherapie und dem chirurgischen Entfernen eines Tumors ist die Chemotherapie nach wie vor ein entscheidendes Element einer Krebstherapie⁵⁷. Da Chemotherapeutika jedoch auch im gesunden Gewebe ihre Wirkung entfalten, bringt diese Behandlung erhebliche Nebenwirkungen mit sich, die den ohnehin schon geschwächten Organismus zusätzlich belasten⁵⁸. Ein Medikament, welches ausschließlich lokalisiert im Tumor seine Wirkung entfalten könnte, wäre daher von großem Vorteil. Photoschaltbare Verbindungen könnten dieser Anforderung gerecht werden. So könnte beispielsweise ein Medikament in seiner biologisch inaktiven Form appliziert und durch lokale Bestrahlung am Tumor in seine aktive Form überführt werden. Durch die zeitlich begrenzte Aktivierung wäre der Schaden für das umliegende Gewebe minimal. Als zusätzlichen Vorteil könnte die zytotoxische Substanz außerdem in erhöhter Menge verabreicht werden⁵². In Abbildung 7 ist das Prinzip einer photoinduzierten Chemotherapie einer herkömmlichen Therapie gegenübergestellt.

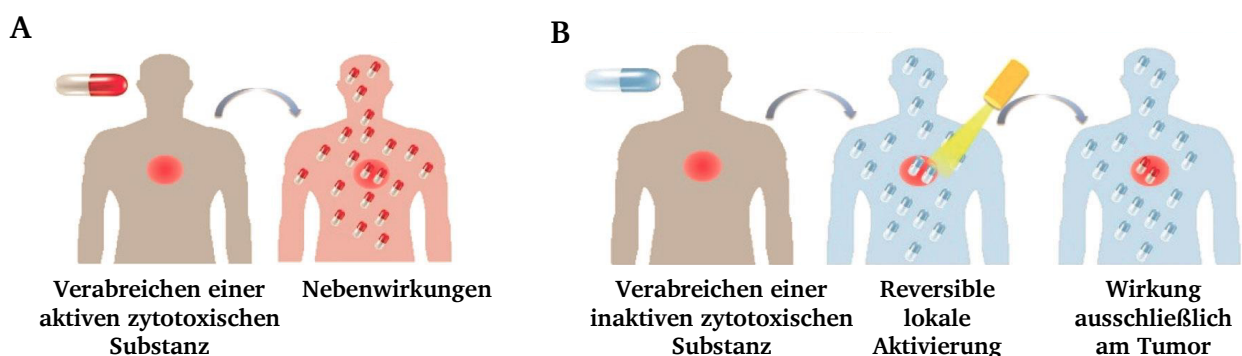


Abbildung 7: Vergleich zwischen herkömmlicher und photoinduzierter Chemotherapie. (A) In einer herkömmlichen Chemotherapie kann es zu erheblichen Nebenwirkungen außerhalb des Tumors kommen. **(B)** Eine reversible Aktivierung des Medikamentes (blau = inaktiv, rot = aktiv) ermöglicht eine lokalisierte Behandlung des Tumors. Die Abbildung wurde modifiziert nach Szymanski *et al.*⁵².

Für die Behandlung bestimmter Krebsarten wie Hodgkin-Lymphom, kutanen T-Zelllymphoms oder Ovarialkarzinom sind bereits **Histon-Deacetylase-Inhibitoren (HDACi)** als Zytostatika zugelassen oder befinden sich zumindest in einer späten klinischen Testphase^{5, 59-61}. Dazu zählen Vorinostat (Handelsname Zolinza®), Belinostat (Handelsname Beleodaq®), Romidepsin (Handelsname Istodax®) oder Panobinostat (Handelsname Farydak®). Mit Ausnahme von Romidepsin sind alle aufgezählten Verbindungen Derivate von Hydroxamsäuren, welche eine allgemein hohe Affinität zum katalytischen Zinkion der HDACs zeigen.

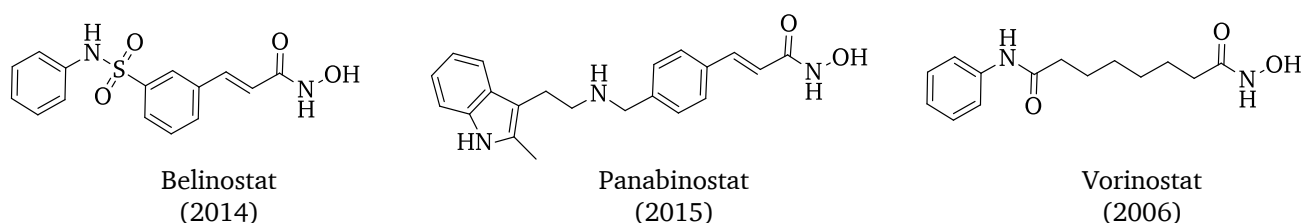


Abbildung 8: Als Wirkstoff gegen Krebserkrankungen zugelassene HDAC-Inhibitoren auf Basis von Hydroxamsäuren.

Auf Basis der in Abbildung 8 gezeigten Medikamente Belinostat und Panabinostat wurden von Claire Weston am Imperial College photoschaltbare HDAC-Inhibitoren synthetisiert. Als photoschaltbare Einheiten wurden das in 1.4.1 erwähnte Azobenzol sowie ein daraus abgeleitetes Arylazopyrazol verwendet. Die notwendigen Anforderungen wie ein hoher Anteil des *cis*-Isomeres im photostationären Gleichgewicht sowie dessen Langlebigkeit wurden bereits validiert und veröffentlicht^{52, 62}. Die Inhibitoren, die in dieser Arbeit getestet wurden sind in Abbildung 9 dargestellt.

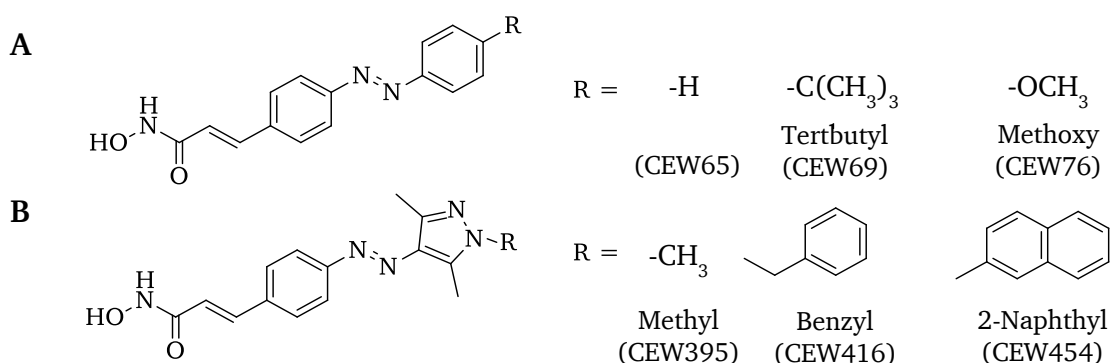


Abbildung 9: Photoschaltbare Inhibitoren. (A) Auf Basis von Azobenzol (B) Auf Basis von Arylazopyrazol. Es wurden jeweils drei verschiedene Derivate von hergestellt, die sich durch die angegebenen Reste unterschieden. Die Namen in Klammern geben die interne Benennung der Substanzen wieder, von denen in dieser Arbeit die Rede sein wird.

1.5. Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assay

1.5.1. Assay-Prinzip (physikalische Grundlagen)

Die Fluoreszenzlebensdauer (engl. *fluorescence lifetime*, kurz FLT) ist die mittlere Zeit, in der ein Molekül in seinem angeregten Zustand verweilt. Diese Zeit ist maßgeblich von der Umgebung des Fluorophors abhängig. Bindet beispielsweise ein fluoreszierender Ligand im Aktivzentrum eines Proteins, kann sich seine FLT aufgrund der unterschiedlichen Polarität im Vergleich zur wässrigen Lösung ändern. Daneben können auch Energietransfermechanismen wie der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET), Dexter-Energietransfer oder der photoinduzierte-Elektronentransfer eine Rolle spielen⁶³. Die Änderung der FLT liegt im Bereich von Nanosekunden und erfordert eine Messapparatur mit entsprechender Zeitauflösung.

Bei einem Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assay wird dieser Effekt praktisch ausgenutzt. Dazu wird das zu untersuchende Enzym mit einem fluoreszierenden Ligand im Unterschuss inkubiert, bis sich eine konstante FLT einstellt. Anschließend wird ein potenzieller Inhibitor zugegeben und nach erneuter Einstellung des Gleichgewichtes, die Änderung in der FLT detektiert. Dies kann zum einen halbqualitativ für ein Hochdurchsatzscreening (HTS) genutzt werden. Wobei eine definierte Konzentration des potenziellen Inhibitors zugegeben wird und validiert, ob eine kompetitive Verdrängung stattfindet (positiv Hit) oder nicht (negativ Hit). Zum anderen kann es auch für quantitative Messungen genutzt werden. Hierzu wird der Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen zugegeben und aus der sukzessiven Änderung der FLT, können anschließend Parameter wie die Bindungskonstanten abgeleitet werden.

1.5.2. Anforderungen an einen effizienten Assay

Da FLT-Assays allgemein eine schnelle Durchführung des Experimentes erlauben, sind sie besonders für das Hochdurchsatzscreening (HTS) interessant. Allerdings sind die Anforderungen hier besonders hoch und lassen sich in allgemeine und spezielle unterteilen:

Allgemeine Voraussetzung an HTS:

1. Einfache Durchführung (Mischen- und Messen-Prinzip)
2. Möglichkeit der Miniaturisierung und Parallelisierung
3. Chemische Stabilität der eingesetzten Assay-Komponenten (Liganden, Enzyme etc.)
4. Kosteneffizienz durch geringen Einsatz von Protein und Ligand
5. Möglichst hoher Z'-Faktor ($\geq 0,7$)

Spezielle Anforderungen an FLT-Assay:

6. Die Anregungs- und Emissionswellenlänge sollte möglichst im langwelligen Bereich liegen und die Stokes-Verschiebung so groß wie möglich sein, um eine spektrale Unterscheidung zwischen Messsignal und autofluoreszierenden Verunreinigungen zu gewährleisten.
7. Der FLT-Unterschied im gebunden und nicht gebunden Zustand sollte möglichst groß sein, um zwischen Signal und möglicherweise auftretender störender Autofluoreszenz anderer Komponenten zu differenzieren.
8. Der bindende Ligand sollte mit mittlerer Affinität an das Enzym binden, damit er auch von weniger potenten Inhibitoren kompetitiv verdrängt werden kann.

1.6. Röntgenstrukturanalyse von Proteinen

1.6.1. Kristallisation

Um die dreidimensionale Struktur eines Proteins aufzuklären, ist die Röntgenbeugung die am häufigsten verwendete Methode⁶⁴. Dazu ist es notwendig, die Proteine in einkristalliner Form zu erhalten. Hierzu hat sich die Kristallisation per Gasphasendiffusion durchgesetzt, die entweder mit einem hängenden oder sitzenden Tropfen (*engl. hanging & sitting drop*) durchgeführt werden kann. Beiden liegt jedoch dasselbe physikalische Prinzip zugrunde⁶⁵.

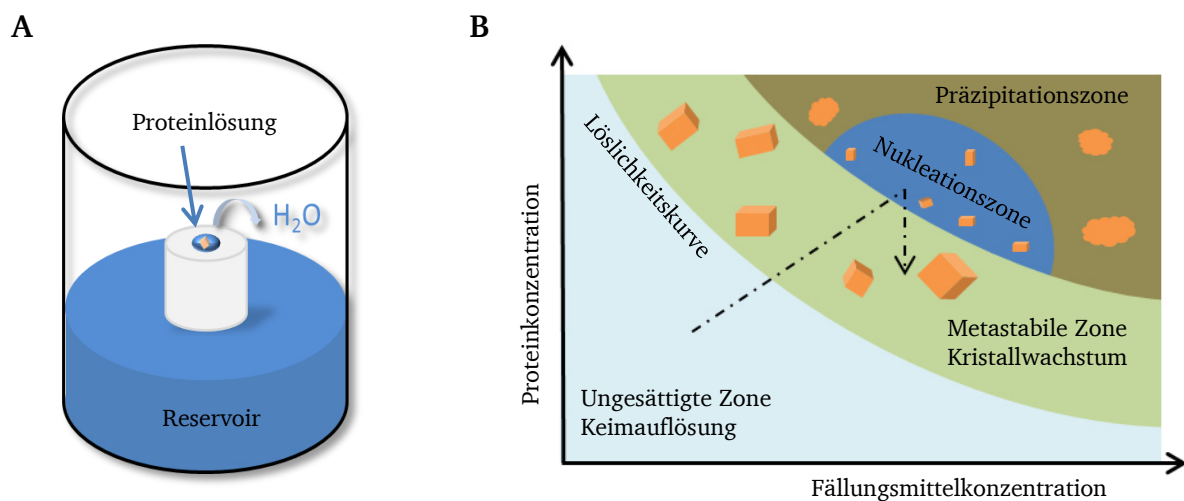


Abbildung 10: Kristallisationsgrundlagen. (A) Skizze der *sitting-drop*-Methode. (B) Schematische Darstellung eines Phasendiagramms. Es zeigt die Abhängigkeit der Phasen von der Protein- und Fällungsmittelkonzentration. Der Pfeil spiegelt den Optimalfall wieder. Durch Wasserdampfdiffusion erhöhen sich Proteinkonzentration sowie Fällungsmittelkonzentration. Kommt es zur Keimbildung verringert sich die Proteinkonzentration wieder und das System gelangt in die metastabile Phase, bei der die Kristalle wachsen sich aber keine neuen Keime mehr bilden.

Das reine Protein (min. ≥ 95 %) wird hierbei mit Fällungsmitteln, wie in Puffer gelösten Salzen, organischen Lösungsmitteln oder Zuckerpolymeren etc. vermischt und als Tropfen in einen gasdichten Raum überführt. Neben dem Tropfen befindet sich das Fällungsmittel in einem Reservoir (Abbildung 10A). Da in beiden Systemen unterschiedliche Salzkonzentrationen vorherrschen, gleichen sich diese durch Gasphasendiffusion aus. Im Optimalfall gelangt das System durch die stetige Konzentrierung des Proteins sowie der Fällungsmittel in die Nukleationszone, in der sich Kristallisationskeime bilden (Abbildung 10B). Durch die Kristallisation verringert sich die Proteinkonzentration wieder und das System gelangt in einen metastabilen Zustand, in dem die Kristalle zwar weiter wachsen, aber sich keine neuen Kristallisationskeime mehr bilden.

Die Kristallisation hängt von zahlreichen Faktoren wie pH-Wert, Puffersystem, Additiven, Detergenzien, Proteinkonzentration, oxidierende oder reduzierende Bedingungen sowie der Temperatur ab. Geschieht der beschriebene Prozess beispielsweise zu schnell, können sich keine Kristallisationskeime bilden und das Protein präzipitiert. Sind die Fällungsmittelkonzentrationen zu gering, bleibt das System in Lösung. Gegenwärtig gibt es keine zuverlässige Vorhersage, unter welchen Bedingungen ein Protein kristallisiert, weshalb zu Beginn der Kristallisationsversuche meist Hochdurchsatz-Methoden mit verschiedenen Kristallisationsbedingungen eingesetzt werden⁶⁶⁻⁶⁸.

1.6.2. Röntgenbeugung

Ein Einkristall ist ein in allen Raumrichtungen periodisch aufgebauter, homogener Festkörper. Die kleinste die Kristallstruktur wiedergebende Einheit wird als Elementarzelle bezeichnet. Durch ein Kristallgitter können beliebig viele sogenannter Netzebenen gelegt werden, die durch Angabe der reziproken Achsenabschnitte h , k , l (Millersche Indizes) definiert werden. Für einen Beobachter erscheint es, als würde die einfallende Röntgenstrahlung an diesen Netzebenen reflektiert. Ein auftretender Reflex im Diffraktionsmuster entspricht einer ganzen Schar von parallel aufgespannten Netzebenen. Die Reflexe eines Einkristalls stellen selbst ein Gitter dar, welches in reziproken Zusammenhang mit dem realen Kristallgitter steht. So entspricht die Anordnung von Reflexen auf dem Detektor einer direkten Projektion des reziproken Gitters. Die physikalische Grundlage für das Auftreten von Reflexen bildet die Bragg-Gleichung. Sie besagt, dass ein Reflex nur dann auftreten kann, wenn die Bedingung für konstruktive Interferenz erfüllt ist⁶⁴.

$$n\lambda = 2d_{hkl} \sin \theta \quad [\text{Gl. 1}]$$

mit λ = Wellenlänge der einfallenden Strahlung
 d_{hkl} = Abstand der Netzebenen
 θ = Glanzwinkel

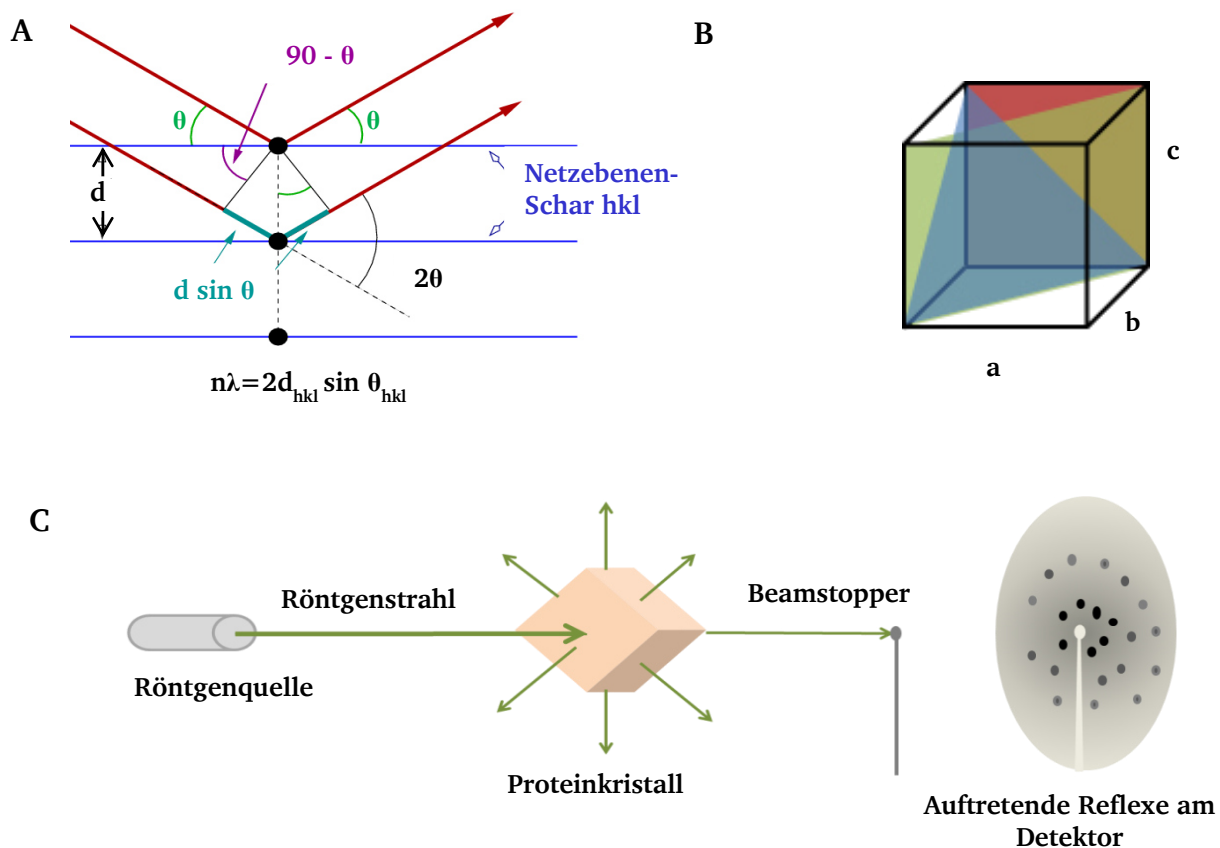


Abbildung 11: Grundlagen Röntgenbeugung. (A) Illustration der Bragg-Gleichung: Die einfallenden Strahlen (rot) werden an den Netzebenen (blau) reflektiert. Positive Interferenz tritt nur dann auf, wenn der Gangunterschied ein ganzzahliges Vielfaches der Wellenlänge beträgt. (B) Auswahl an drei möglichen Netzebenen (rot, blau, grün) in einer kubischen Elementarzelle. Rot hätte beispielsweise die Millerschen Indizes (0; 1; 0), blau (1; 1; 1), grün (1; 1; 0). Parallel zu jeder dieser Ebenen verlaufen theoretisch unendlich viele solcher Netzebenen. (C) Schematische Darstellung eines Röntgenbeugungsexperimentes. Für alle auftretenden Reflexe am Detektor ist die Bragg-Gleichung erfüllt. Um einen vollständigen Datensatz zu erhalten, muss der Kristall während der Messung rotiert werden, um bei gegebenen Netzebenenabständen d alle Glanzwinkel θ abzudecken. Die relativen Positionen der Reflexe zueinander gibt Auskunft über die Elementarzelle, die Intensität der jeweiligen Reflexe die Elektronenverteilung innerhalb dieser Zelle.

Die relativen Positionen der Reflexe, die am Detektor auftreten, geben Aufschluss über den Aufbau der Elementarzelle. Das Verhältnis der Intensitäten aller Röntgenreflexe zueinander enthält Information über die Atomanordnung (Elektronendichte) innerhalb der jeweiligen Elementarzelle. Die ortsabhängige Elektronendichte ρ lässt sich durch folgende Gleichung berechnen:

$$\rho(x,y,z) = \frac{1}{V} \sum_{hkl} F(hkl) \exp(-2\pi i(hx + ky + lz)) \quad [\text{Gl. 2}]$$

Hierbei sind x, y, z die Koordinaten im Realraum und $F(h,k,l)$ ist der sogenannte Strukturfaktor. Dieser enthält alle Informationen über die Lage der Atome innerhalb der Elementarzelle und lässt sich wie folgt berechnen:

$$F_{hkl} = |F_{hkl}| \exp(i\varphi_{hkl}) \quad [\text{Gl. 3}]$$

mit φ = Phase

Hierbei tritt ein schwerwiegendes Problem auf: Während sich die Amplituden überlagern und sich damit die Intensität der Reflexe erhöht, gehen die Phaseninformationen vollständig verloren. Dies wird in der Literatur als „Phasenproblem“ bezeichnet⁶⁹.

Dieses Problem kann auf verschiedene Arten gelöst werden. Eine davon ist die des molekularen Ersatzes. Dazu muss allerdings bereits eine ähnliche Struktur des zu untersuchenden Proteins bekannt sein. Ist dies der Fall, können aus den Koordinaten dieser Struktur die Strukturamplituden und Phasen berechnet werden. Das Modell wird hierbei zur Bestimmung der Position und Orientierung des Moleküls in der Elementarzelle verwendet. Dies stellt ein sechsdimensionales Problem dar, welches sich in drei Rotations- und drei Translationsfunktionen zerlegen lässt^{70, 71}

Ist keine ähnliche Struktur bekannt, so wird die Methode des isomorphen Ersatzes verwendet. Hierbei werden Schwermetallionen zum Kristall gegeben, die im Idealfall immer an die gleichen Stellen innerhalb der Elementarzelle binden. Der Kristall wird bei verschiedenen Wellenlängen (MAD-Experiment *multiple wavelength anomalous dispersion*) gemessen. Durch Intensitätsunterschiede zwischen dem nativen und dem isomorphen Datensatz kann die Position der Schwermetallionen in der Zelle bestimmt werden. Die dadurch gewonnenen Phaseninformationen erlauben eine erste grobe Abschätzung der Phasen⁶⁹.

1.7. Fragestellung und Zielsetzung

Die Motivation für dieses Projekt lieferten vorangegangene Studien, die Polyaminen eine essenzielle Rolle bei der Biofilmbildung von Bakterien zuschrieben^{30, 31, 72, 73}. Biofilme stellen eine wichtige Verteidigungsstrategie des Humanpathogens *Pseudomonas aeruginosa* dar, da sie unter anderem als Schutzwall gegen Antibiotika fungieren. Die vorliegende Arbeit war Teil eines DFG-Projektes, welches die grundlegende Fragestellung untersuchen sollte, ob eine Inhibition von Acetylpolymamin-Amidohydrolasen (APAHs) sich negativ auf die Biofilmbildung oder direkt auf das Wachstum von *P. aeruginosa* auswirkt. Wäre dies der Fall, könnten sich so neue Behandlungsmöglichkeiten zur Bekämpfung bakterieller Infektionen ergeben.

Im Genom von *P. aeruginosa* wurden drei Enzyme identifiziert, die zur Histon-Deacetylase-Superfamilie gehören und als putative APAHs vorhergesagt waren³⁶. Dabei handelt es sich um die Enzyme PA0321, PA1409 und PA3774. Die Enzyme PA0321 und PA1409 waren in der Literatur im Rahmen einer Transkriptomanalyse als APAHs beschrieben⁷⁴. Das Enzym PA3774 wurde bereits rekombinant produziert und zeigte einen Umsatz von artifiziellen HDAC-Substraten⁷⁵. Allerdings lag der Fokus in den betreffenden Studien nicht auf diesen Enzymen, wodurch viele Fragen offen blieben.

Aus der Fragestellung und Ausgangslage ergaben sich folgende Ziele, die hier nach Priorität geordnet sind:

- 1) Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der Charakterisierung der Proteine PA0321, PA1409 und PA3774. Neben der Suche nach den natürlichen Substraten sowie Inhibitoren lag der Fokus insbesondere auf der Strukturaufklärung. Die daraus gewonnenen Informationen sollten Forschern aus der Medizinischen Chemie dazu dienen potente und selektive Inhibitoren für diese Enzyme zu entwickeln.
- 2) Parallel dazu sollte in Zusammenarbeit mit Zellbiologen am Karlsruher Institut für Technologie (KIT), die biologische Funktion dieser Enzyme *in vivo* untersucht werden. Besonderes Interesse galt dabei dem postulierten Zusammenhang zwischen Polyaminen und Biofilmbildung. Durch verschiedene *Knock-out*-Mutanten und Zugabe potenter Inhibitoren sollte der Einfluss dieser Enzyme auf das Wachstum sowie die Biofilmbildung von *P. aeruginosa* überprüft werden.
- 3) In einem Nebenprojekt sollte in Kooperation mit der Universität Potsdam ein neuartiger Fluoreszenzlebensdauer-Assay entwickelt werden, der ein Hochdurchsatz-Screening zur Auffindung neuer Inhibitoren für diese Enzymfamilie ermöglicht.

-
- 4) In einem weiteren Nebenprojekt sollte, in Kooperation mit dem Imperial College London, das Inhibitionsverhalten photoschaltbarer Substrate in ihrer *cis*- und *trans*-Konfiguration auf bakterielle wie auch menschliche HDAC-Enzyme untersucht werden, mit dem Ziel Grundlagen für eine photodynamische Therapie zu legen.

2. MATERIALIEN

2.1. Chemikalien

Standard Chemikalien wurden in über die Hersteller AppliChem (Darmstadt), Merck (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Thermo Fisher Scientific (Dreieich), Sigma-Aldrich (Steinheim) und Calbiochem (Darmstadt) bezogen.

Besondere Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
7-Amino-4-methylcoumarin (AMC)	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Boc-Lys(Ac)-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Boc-Lys(TFA)-AMC	Bachem, Bubendorf, Schweiz
Pluronic F 68	BASF, Ludwigshafen
NAD ⁺	Merck, Darmstadt
NADH	Carl Roth, Karlsruhe
Acetyl-CoA	AppliChem, Darmstadt
ATP	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hydroxybutan-1,4-disäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Paratone-N	Hampton, USA
TCEP	Calbiochem, Darmstadt

2.2. Kits

E.Z.N.A. Gel Extraction Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
E.Z.N.A. Plasmid Mini Kit	Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA
GenElut PCR Clean-Up Kit	Sigma-Adrich, Steinheim
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Dreieich

Die Durchführung der aufgelisteten Kits erfolgte nach Herstellerangaben.

2.3. Bakterienstämme

<i>E. coli</i> BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	Stratagene, La Jolla, USA
<i>E. coli</i> XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA

2.4. Proteine und Marker

Protein

BSA (Rinderserumalbumin)
Diamin Oxidase (aus Schweineniere)
DpnI, EcoRI, NdeI
DreamTaq DNA-Polymerase
Pfu DNA-Polymerase
T4 DNA Ligase
Trypsin (aus Rinderpankreas)
Meerrettichperoxidase
Citratsynthase
L-Malatdehydrogenase (Schweineherz)
XhoI, AseI
HDAC1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8

Hersteller

Serva Electrophoresis, Heidelberg
Sigma-Aldrich, Steinheim
Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Sigma-Aldrich, Steinheim
Merck, Darmstadt
Fermentas
Biomol, Hamburg

Marker

GeneRuler DNA Ladder Mix
PageRuler Unstained Protein Ladder

Hersteller

Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Thermo Fisher Scientific, Dreieich

2.5. Kristallisation Screens

NeXtal Classics
NeXtal Classics 2
NeXtal 2 Anion Suit
NeXtal Cation Suit
NeXtal MBclass Suit
NeXtal MBclass 2 Suite
NeXtal pHClear Suite
Additive Screen HT
JBScreen PEG/Salt 1
JBScreen PEG/Salt 2
JBScreen PEG/Salt 3
JBScreen PEG/Salt 4

Qiagen, NL
Qiagen, NL
Qiagen, NL
Qiagen, NL
Qiagen, NL
Qiagen, NL
Qiagen, NL
Hampton, USA
Jena Bioscience, Jena
Jena Bioscience, Jena
Jena Bioscience, Jena
Jena Bioscience, Jena

2.6. Gene und Vektoren

Gen	Vektor	Verwendung	Hersteller
<i>pa3774</i>	pET 21a(+) CPD	Expression	Novagen, De
<i>pa1409</i>	pET 21a(+) CPD	Expression	Novagen, De
<i>pa0321</i>	pET 21a(+) CPD	Expression	Novagen, De
<i>Acetyl CoA Synthetase</i>	pET 20b(+)	Expression	Novagen, De
<i>hdah (FB188)</i>	pQE70-MCS	Expression	Qiagen, NL
<i>pa0321</i>	pUC57	Klonierung	geneScript, USA

2.7. Oligonukleotide (Primer)

Mutageneseprimer (<i>pa3774</i>)	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
H143A_forward	TCGCGGCCCGCCAGGT GCG CACTGCCTGCCGGACCAG
H143A_reverse	CTGGTCCGGCAGGCAGT GCG CACCTGGCGGCCGCGA
H144A_forward	CGGCCGCCAGGTCAT GCCT GCCTGCCGGACCAGGCG
H144A_reverse	CGCCTGGTCCGGCAGGCAG GCAT GACCTGGCGGCCG
Y313F_reverse	CGGCACGTAGGCTTCCGAGAAGCCGCCTTCGTGGACCAC
Y313F_forward	CGAAGGCGGGCT TTCT CGGAAGCCTACGTGCCGTTCTGC
Y313H_forward	TGGTCCACGAAGGCGGCC ACT CGGAAGCCTACGTGC
Y313H_reverse	GCACGTAGGCTTCCGAGT TGGCC GCCTTCGTGGACCA
Sequenzierungsprimer	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
T7 Promotor_forward	TAATACGACTCACTATAGGG
CPD Terminator_reverse	AGTTTCGCCACCGTCAGT
Rückmutationsprimer (<i>pa1409</i>)	Oligonukleotidsequenz (5'-3')
Pointmutation_forward	TCATGGAAGGCGGCTATGCGGTGGA
Pointmutation_reverse	TCCACCGCATAGCCGCCTTCCATGA
Insert_forward	GTTTCGAAATGCCAGCCGGGCCGAC
Insert_reverse	GTCGGCCCCGGCTGGGCATTTGAAAC

Fettgedruckte Basen geben die Mutation an.

2.8. Puffer, Lösungen und Medien

Einsatzgebiet	Zusammensetzung
Standard Lösepuffer:	20 mM HEPES pH 8 50 mM NaCl
Kristallisations- und Lagerungspuffer PA3774, PA0321, PA1409	20 mM HEPES pH 8 50 mM NaCl 2 mM TCEP
Kristallisation & Lagerungspuffer HDAH	20 mM Tris-HCl pH 8 50 mM NaCl 2 mM TCEP
CPD-Elutionspuffer	20 mM HEPES pH 8 50 mM NaCl 50 μ M Phytinsäure
His-Taq-Elutionspuffer	20 mM HEPES pH 8 50 mM NaCl 500 mM Imidazol
Lysepuffer	20 mM HEPES pH 8 500 mM NaCl
AMC-Assay-Puffer (bakterielle HDACs)	20 mM HEPES pH 8 50 mM NaCl 0,001 % (v/v) Pluronic F-68
AMC-Assay-Puffer (menschliche HDACs)	25 mM Tris-HCl pH 8 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 0,001 % (v/v) Pluronic F-68

Acetat-Assay-Puffer	50 mM HEPES pH 8 127 mM NaCl 2,7 mM KCl 6 mM MgCl ₂
Diamin-Assay-Puffer	100 mM HEPES pH7.4 280 mM NaCl 10 mM KCl 4 mM CaCl ₂ 2,8 mM MgCl ₂
TAE-Puffer	20 mM Essigsäure 1 mM Na ₂ -EDTA 40 mM TRIS-HCl pH 8,5
DNA-Auftragspuffer (6×)	0,03 % (w/v) Bromphenolblau 60 % (v/v) Glycerin 60 mM Na ₂ -EDTA 10 mM TRIS-HCl pH 8,5
SDS-Elektrophoresepuffer (10×)	1,92 M Glycin 250 mM TRIS-HCl pH 8.9 1 % (w/v) SDS
SDS-Auftragspuffer (2×)	0,04 % (w/v) Bromphenolblau 20 % (v/v) Glycerin 2 % (v/v) β-Mercaptoethanol 4 % (w/v) SDS 100 mM Tris-HCl pH 6.8
LB-Medium (steril)	10 g/l Pepton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl

SOC-Medium (steril)	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	2 % (w/v) Pepton
	20 mM Glukose
	2,5 mM KCl
	10 mM NaCl
	10 mM MgCl ₂
	10 mM MgSO ₄
Coomassie-Färbelösung	0,1 % Coomassie blue R-250
	40 % Methanol
	10 % Essigsäure
Coomassie-Entfärbelösung	40 % Methanol
	10 % Essigsäure

2.9. Reinigungs- und Analytik-Säulen

Typ	Material	Hersteller
GPC	Superdex 200 Increase 3.2/300	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
GPC	Superdex 200 HiLoad 16/60	GE Healthcare, Chalfont St. Giles
IMAC	Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, Chalfont St. Giles

2.10. Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Varioklav 75S HP	Oberschleißheim
Brutschrank	TH 30	Edmund Bühler, Hechingen
	SM-30	Edmund Bühler, Hechingen
Chromatographieanlage	Äkta Prime plus	GE Healthcare, Chalfont, St. Giles
Fluoreszenzspektrometer:	Pherastar plus	BMG Labtech, Ortenberg
	POLARstar Optima	BMG Labtech, Ortenberg
Küvette	µCuvette G 1.0	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipette	Research 10-100 µl	Eppendorf, Hamburg
MTP-Plattenleser	Digiscan 340	Asys Hightech, Eugendorf
Multipipette	Stream®	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research	Eppendorf, Hamburg
Schikanekolben	50 ml, 100 ml, 2l	Glasgerätebau Ochs, Bovenden
Spektrometer:	Biospectrometer basic	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbänke Sikl. 2	Hera Safe	Kendro, Hanau
	Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Langenselbold
Thermomixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	T Gradient	Biometra, Göttingen
Ultraschallstab	Digital Sonifier 25C	Branson Ultrasonics Corp. Danbury
Waagen	Adventurer Feinwaage	Ohaus, Nänikon, CH
	Explorer Analysenwaage	Ohaus, Nänikon, CH
Zentrifugen	3K30C	Sigma, Taufkirchen
	6-16K	Sigma, Taufkirchen
	Mini Spin	Eppendorf, Hamburg
pH-Elektrode	blueline 14pH	SI Analytics, Mainz
UV-A Lampe	6 W, UV-A Röhre 366 nm,	Sylvania, England
Bandpassfilter	340 ± 10 nm	PerkinElmer, Rodgau
Infrared Imaging System	Odyssey SA	LI-COR, Bad Homburg
Gel-Imager	BioDoc Analyzer	Biometra, Göttingen
Agarosegel- phoresekammer	VWR 101202 102	VWR, Darmstadt
SDS-PAGE- phoresekammer	Mini-Protean 3 Cell	Bio-Rad, München
Netzgeräte	EPS 600	PharmaciaBiotech, Schweden
	VWR Power Source 250 V	VWR, Darmstadt
Pipettierroboter	mosquito HTS	ttplabtech, USA

2.11. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung

Kristalldeckgläser Circle Cover Slides
Küvetten
Mikrotiterplatte 96-Well Flat-Bottom Half Area
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl
Pipettenspitzen 5000 µl
Reaktionsgefäße 0,3 ml, 1,5 ml, 2 ml
Silikon mittelviskos
Spritzen 5ml ,10 ml, 20 ml B.
Sterilfilter 0,22 µm, 0,45 µm
SuperClear Pregreased 24-Well Plate
Vakuumfilter Express Plus 0,22 µm
Zentrifugenröhrchen, 15 ml, 50 ml
Zentrifugenröhrchen, 5 ml, 30 ml
Konzentrator Vivaspin (30.000 MWCO)
Viewdrop 96, Hanging-drop-seal

Hersteller

Hampton, USA
Sarstedt, Nümbrecht
Greiner, Frickenhausen
Sarstedt, Nümbrecht
VWR, Darmstadt
Sarstedt, Nümbrecht
Bayer, Leverkusen
Braun, Melsungen
Sarstedt, Nümbrecht
Crystalgen, Commack US-NY
Millipore, Billerica US-MA
Greiner, Frickenhausen
Sarstedt, Nümbrecht
Sartorius, Göttingen
ttplabtech, USA

3. METHODEN

3.1. Molekularbiologische Methoden

3.1.1. Expression und Isolierung von Plasmid-DNA

Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden die jeweiligen Klone gepickt und in ca. 6 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Plasmid-DNA wurde nach dem Benutzerhandbuch des Plasmid-DNA Mini Kits I extrahiert.

3.1.2. Agarose-Gelelektrophorese

a) Prinzip:

Die Agarose-Gelelektrophorese wird zur Größenbestimmung von DNA verwendet und kann dabei analytisch wie präparativ eingesetzt werden. Das Prinzip beruht darauf, dass DNA-Fragmente, in Abhängigkeit ihrer Größe, elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt werden. Die DNA-Fragmente können im Anschluss durch Lichtanregung eines mit der DNA interkalierenden Farbstoffes visualisiert werden⁷⁶.

b) Durchführung:

Die analytische als auch die präparative Agarose-Gelelektrophorese erfolgten mit 1,5%igen Agarosegelen. Zur Herstellung von 1,5%igen Agarosegelen wurden 3 g Agarose in 200 ml TAE-Puffer gelöst und erhitzt. Nachdem die Lösung auf ca. 30-40 °C abgekühlt war, wurde 0,002 % (v/v) des Fluoreszenzfarbstoffs Midori Green Advanced zugegeben und das Gel in eine Elektrophoresekammer gegossen, wo es ca. 30 min aushärtete. Die DNA-Proben wurden mit 6-fachem DNA-Auftragspuffer vermengt und die Geltaschen pipettiert. Als DNA-Größenstandard wurden 6 µl des GeneRuler DNA-Ladder-Mix (Thermo Fisher Scientific) aufgetragen. Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 120 V für eine Stunde. Die Visualisierung der DNA-Fragmente erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 254 nm mit dem Gerät BioDoc Analyzer (Biometra). Die Durchführung der analytischen und präparativen Agarose-Gelelektrophorese unterschied sich dahingehen, dass bei der präparativen mehr DNA verwendet wurde und die gewünschten Fragmente für die spätere Ligation nicht UV-Licht ausgesetzt wurden.

3.1.3. Klonierung und Ligation von Plasmid-DNA

a) Prinzip:

Die Ligation ist eine Methode zur Einführung von Fremd-DNA in ein gewünschtes Plasmid durch enzymkatalysierte Verknüpfung zweier DNA-Segmente. Dabei wird das 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende der Nukleinsäuren-Segmente mithilfe des Enzyms Ligase verbunden⁷⁶.

b) Durchführung:

Das Gen *pa0321* flankiert mit den Schnittstellen *NdeI* am 3'-Ende und *XhoI* am 5'-Ende wurde kodonoptimiert bei der Firma GeneScript (USA) bestellt. Um das Gen vom erhaltenen pUC57-Vektor in den zur Proteinexpression bestimmten Vektor pET21a(+)-CPD zu überführen, wurde eine präparative Agarose-Gel Extraktionsmethode verwendet. Dazu wurde der pUC57 Vektor sowie der pET21(+)-CPD-Zielvektor, der die gleichen Schnittstellen besaß, zusammen mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI* verdaut. Anschließend wurden die DNA-Segmente mittels präparativer Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Das Genfragment *pa0321* sowie der pET21a(+)-CPD-Vektor wurden aus dem Gel ausgeschnitten, extrahiert und mittels T4-DNA-Ligase ligiert. Die Vorgehensweise erfolgte nach dem Benutzerhandbuch des E.Z.N.A. Gel Extraction Kit.

3.1.4. Konzentrationsbestimmung von DNA

a) Prinzip:

Die Konzentration sowie der Reinheit von DNA-Proben kann mittels UV-Absorptionsmessung bestimmt werden. Die Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm. Das Verhältnis von A₂₆₀ zu A₂₈₀ diente als Bestimmtheitsmaß der Reinheit. Der Quotient (A₂₆₀/A₂₈₀) sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 sein. Niedrigere Werte deuten auf Verunreinigungen beispielsweise von Proteinen hin, die bei ca. 280 nm absorbieren.

b) Durchführung:

Die Konzentrations- sowie Reinheitsbestimmung von Plasmid-DNA-Proben erfolgte mit einem UV/Vis-Spektralphotometer (BioSpectrometer, Eppendorf). Dazu wurden 2 µl der jeweiligen DNA-Probe in die Mikrolitermesszelle (µCuvette G1.0, Eppendorf) pipettiert und die Absorption detektiert. Als Blindwert diente steriles Wasser.

3.1.5. Hitzeschock-Transformation

Bei dieser Methode werden Plasmide, die das gewünschte Gen enthalten, in chemisch-kompetenten Zellen eingeschleust⁷⁷. Das in dieser Arbeit verwendete Ablaufprotokoll ist in Tabelle 1 dokumentiert.

Tabelle 1: Ablaufprotokoll der Hitzeschock-Transformation.

Hitzeschock-Transformation
Auftauen der kompetenten <i>E. Coli</i> BL21 oder <i>E. Coli</i> XL1 Blue Zellen
2-5 μ l Vektor + 50 μ l kompetente Zellen; Inkubation für 30 min auf Eis
Hitzeschock für 30 sec bei 42 °C
Abkühlen auf Eis
Zugabe von 250 μ l 42 °C warmen SOC-Medium
Inkubation für 50 min bei 37 °C unter Schütteln
Zentrifugation für 3 min bei ca. 10 000 \times g bei Raumtemperatur
Entnahme von 80 μ l Überstand, restlichen Überstand verwerfen
Rest resuspendieren und auf mit Ampicillin behandelte LB-Agar Platten ausplattiert

3.1.6. Ortspezifische Mutagenese

Die ortsspezifische Mutagenese ist eine Methode zur gezielten Veränderung einzelner oder mehrere Nukleotid-Bausteine innerhalb eines DNS-Segmentes. Die Durchführung erfolgte nach dem Benutzerhandbuch des QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene. Die Zusammensetzung der Ansätze sowie das Thermocycler Programm sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die verwendeten Primer (Abschnitt 3.1.7) wurden individuell entworfen und über die Firma Biomers GmbH bezogen. Nach Beendigung des Programms wurden zum Verdau parentaler DNA die jeweiligen Ansätze mit 1 μ l der Nuklease DpnI für 2 h inkubiert.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Quick Change und Thermocycler Programm.

QuickChange Zusammensetzung		Thermocycler-Programm		
5 μ l	10x Polymerase-Puffer	Temperatur	Schritt	Zeit
1 μ l	dNTPs (10 mM)	95 °C	Denaturierung	5 min
2 μ l	forward-primer (10 pmol/ μ l)	95 °C		1 min
2 μ l	reverse-primer (10 pmol/ μ l)	T _{Schmelz} -6 °C	Annealing	1 min
0,5 μ l	Pfu-Polymerase	72 °C	Elongation	9min
4 μ l	MgSO ₄ (25 mM)	72°C	finale Elongation	5 min
1 μ l	Plasmid-DNA (157 ng/ μ l)	4 °C	Aufbewahrung	
35 μ l	H ₂ O			

3.1.7. DNA-Sequenzierung

Das Sequenzieren von DNA-Proben erfolgte durch den Sequencing Service der LMU München. Die gewünschten Proben wurden vorbereitet, indem ca. 300 ng Plasmid-DNA mit jeweils 3,2 pmol Sequenzier-Primer (Abschnitt 3.1.7) und einer variablen Menge an Puffer (10 mM TRIS-HCl pH 8,5) auf ein Gesamtvolumen von 7 µl eingestellt wurden. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Protokoll „Cycle, Clean and Run (Big Dye v 3.1)“. Die Rohdaten wurden mithilfe des Programms Chromas Lite ausgewertet und die erhaltenen Sequenzen mithilfe des Programms Serial Cloner v 2.6.1 auf Korrektheit überprüft.

3.2. Mikrobiologische Methoden

3.2.1. Glycerindauerkultur

Bei einer OD₆₀₀ von ca. 2 wurden 500 µl aus einer wachsenden Zellkultur entnommen und mit der gleichen Menge an 80%igen (v/v) Glycerin versetzt. Anschließend wurden diese Dauerkulturen in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur erneuten Verwendung aufbewahrt.

3.2.2. Submerskultivierung von *E. coli* und Proteinexpression

Zur Kultivierung von *E. coli* wurden zunächst ca. 70 µl eines *E. coli*-Kryostocks in einen, mit 50 ml LB-Medium (Abschnitt 3.1.8), befüllten Schikanekolben gegeben und die Kultur über Nacht bei 37 °C und ca. 150 rpm inkubiert. Nach dem Erfassen der OD₆₀₀ wurde jeweils so viel Vorkultur auf 1000 ml Hauptkultur gegeben, dass die Start-OD₆₀₀ ca. 0,06 – 0,1 betrug. Anschließend wurde bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,7-0,9 inkubiert und die Proteinproduktion durch 1 ml einer 1 M IPTG-Lösung induziert. Die weitere Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur über Nacht.

3.2.3. Zellernte

Die Kulturbrühe wurde für 12 min bei ca. 23 000 × g in einer 6K15-Zentrifuge zentrifugiert. Das Sediment wurde mit Lysepuffer gewaschen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.2.4. Zellaufschluss

Das eingefrorene oder frisch zentrifugierte Zellsediment wurde in Lysepuffer resuspendiert (ca. 3 ml pro g Zellsediment) und mit einem Ultraschallstab viermal, auf Eis in einer 40-ml-Rosettenzelle (SONOPLUS) aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurden die Zellfragmente in der Zentrifuge bei 26.323 × g für 30 min abgetrennt.

Tabelle 3: Ultraschallaufschluss.

Ultraschallstabprogrammierung	
Dauer	6 min
Amplitude	25 %
Puls	0,5 sec
Pause	0,5 sec

3.3. Proteinchemische Methoden

3.3.1. Affinitätschromatographie

a) Prinzip:

Die Affinitätschromatographie ist ein Trennverfahren zur Isolation von Fusionsproteinen. Bei einer immobilisierten Metallionenchromatographie (IMAC) werden Übergangsmetallionen durch ein chelatierendes Harz immobilisiert. Die zu isolierenden Fusionsproteine werden über ihren Tag koordinativ an die Säule gebunden⁷⁸, während Proteine ohne Tag keine oder geringe Affinität zum Trägermaterial zeigen. Nach einem Waschschrift erfolgt die Elution des Zielproteins meist durch Änderung des pH-Wertes oder durch Verdrängung mittels anderer Substanzen, die ebenfalls eine hohe Affinität zum Trägermaterial aufweisen.

b) Durchführung:

Als Chromatographiesäule wurde eine C10/10 Glassäule (GE Healthcare), befüllt mit ca. 7 ml Iminodiessigsäure modifizierter Sepharose (Chelating Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) verwendet. Als Metallion kam Nickel zum Einsatz. Während der Arbeit wurden zwei unterschiedliche Protokolle verwendet. Die Proteine PA1409, PA0321 und PA3774 sowie deren Mutanten waren C-terminal mit einer Cystein-Protease-Domäne (CPD) fusioniert. Diese CPD-Domäne besaß ihrerseits C-terminal einen Dekahistidin-Tag (Abbildung 12). War das Fusionsprotein an der Säule gebunden, wurde die CPD mit Phytinsäure induziert, woraufhin das Zielprotein abgetrennt wurde, während die CPD weiterhin am Trägermaterial verweilte⁷⁹. Die Elution weiterer Verunreinigungen auf der Säule, sowie der gebundenen CPD, erfolgte im Anschluss bei einer Imidazolkonzentration von 500 mM. Der genaue Ablauf des Chromatographieverfahrens ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Chromatographie wurde mit der Anlage ÄKTAPrime Plus (GE Healthcare) durchgeführt.

Das Protein HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* besaß N-Terminal ein Hexahistidin-Taq und keine CPD-Domäne. Die Reinigung, das Beladen, Waschen und Äquilibrieren der Affinitätssäule war identisch. Lediglich die Elution des Zielproteins unterschied sich dahingehend, dass nach der Vorspülung ein Imidazol-Gradient über 40 ml von 60-500 mM angelegt wurde, um das Zielprotein zu eluieren. Die Reinigung der Acetyl-Co-Synthetase erfolgte analog zum Enzym FB188-HDAH.



Abbildung 12: Schematisches Prinzip einer CPD-modifizierten Histidin-Tag-Reinigung.

Tabelle 4: Protokoll der Nickel Affinitätschromatographie.

Auftragsvolumen [ml]	Lösung	Flussrate [ml/min]	Zweck
20	Wasser	2	waschen
20	100 mM NiCl ₂ -Lösung	2	beladen
20	Wasser	2	waschen
20	Lösepuffer-Puffer	2	Äquilibration
variabel	Probenaufgabe	1	Beladen
30	Vorspülung 60 % Imidazol	1	Elution unspezifischer Proteine
40	50 µM Phytinsäure	0,5	Elution des Zielproteins
20	500 mM Imidazol	2	Elution unspezifischer Proteine
20	50 mM EDTA-Lösung	2	waschen
20	1 M NaOH-Lösung	2	waschen
20	Wasser	2	waschen
20	10 mM HCl-Lösung	2	waschen
20	Wasser	2	waschen
20	20 % (v/v) Ethanol-	2	Aufbewahrung

3.3.2. Größenausschlusschromatographie

a) Prinzip:

Die Größenausschlusschromatographie erlaubt eine Trennung von Proteinen anhand ihres hydrodynamischen Volumens⁷⁶.

b) Durchführung der präparativen Größenausschlusschromatographie:

Die Säule (S200 16/60 HiLoad, GE Healthcare) wurde über Nacht mit der dreifachen Menge an Lösepuffer äquilibriert. Zur Vorbereitung wurden die Proben 10 min an einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um ausgefallene Proteinaggregate zu entfernen. Anschließend wurde die Probe mit einer Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule aufgetragen und mit einer Flussrate von 1 ml/min eluiert. Die Fraktionen wurden gesammelt und die hinreichend reinen Fraktionen vereint und konzentriert.

c) Durchführung der analytischen Größenausschlusschromatographie:

Für eine exaktere Größenbestimmung auftretender Oligomere wurde eine analytische Säule (Superdex 200 Increase 3.2/300, GE Healthcare) verwendet. Die Flussrate betrug konstant 0,02 ml/min. Die Größenbestimmung erfolgte durch Erstellung einer Kalibriergerade mittels Referenzproteine definierter Größe.

3.3.3. Konzentration von Proteinlösungen

Zum Konzentrieren der vereinten Proteinlösungen wurden Konzentratoren der Firma Sartorius Vivascience mit einer Ausschlussgröße von 30 kDa verwendet. Die Filtermembran wurde zuvor mit 5 ml Lösepuffer äquilibriert. Das Konzentrieren erfolgte bei maximal $12.000 \times g$.

3.4. Proteinanalytische Methoden

3.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen durch BCA-Assay

a) Prinzip:

Der Bicinchoninsäure-Assay (BCA) beruht auf der Biuret-Reaktion. Hierbei werden im alkalischen Milieu Cu^{2+} Ionen durch Peptidbindungen des Proteinrückgrates sowie den Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein, zu Cu^+ Ionen reduziert. Diese Ionen bilden mit je zwei BCA-Molekülen einen purpurnen Chelatkomplex, dessen Absorption spektroskopisch bei detektiert werden kann und dessen Intensität im Verhältnis zur Proteinkonzentration steht⁸⁰.

b) Durchführung:

Die Durchführung des Assays erfolgte mithilfe des Pierce BCA Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific). Die Kalibriergerade wurde mit einem Rinderserumalbumin (BSA)-Standard gebildet (1000, 500, 250, 125 und 62,5 $\mu\text{g/ml}$). In jede Kavität wurden 200 μl eines Gemisches bestehend aus 49 % Lösung A und 1 % Lösung B zu 25 μl seriell verdünnter Probelösung (1:10, 1:20, 1:40, 1:80) gegeben. Anschließend wurde für 30 min bei 37 °C und 400 rpm inkubiert. Direkt im Anschluss erfolgte eine Absorptionsmessung bei 550 nm (Digiscan 340, Asys Hitech). Die Proteinkonzentration wurde durch lineare Regression berechnet (MikroWin 2000, Mikrotek).

Tabelle 5: Zusammensetzung des BCA-Assay-Lösungen A und B.

Lösung A (pH 11,25)		Lösung B	
Substanz	Konzentration	Substanz	Konzentration
Bicinchoninsäure	10 g/l	CuSO ₄	40 g/l
Na ₂ CO ₃	20 g/l		
Natriumtartrat	1,6 g/l		
NaOH	4 g/l		
NaHCO ₃	9,6 g/l		

3.4.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

a) Prinzip:

Zur Reinheitsbestimmung von Proteinfractionen kann eine SDS-PAGE verwendet werden⁸¹. Hierbei werden die Proteine mit dem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) behandelt, wodurch sie eine negative Ladung erhalten. Die Trennung erfolgt elektrophoretisch in einem Polyacrylamidgel, anhand des Molekulargewichtes.

b) Durchführung:

Die jeweiligen Proben (2-10 μ l) wurden jeweils mit der entsprechenden Menge an SDS-Auftragspuffer vermengt und in die Geltaschen aufgetragen. Die Gelkammer war gefüllt mit 1 \times SDS-Elektrophoresepuffer und die Separation der Proteine erfolgte bei einer Spannung von 150 V und einer Stromstärke 400 mA für 1 h. Die Zusammensetzungen der Gelkomponenten sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.

Komponente	Trenngel 12,5%	Sammelgel 5%
Acrylamidlösung 29 % (w/v) Acrylamid; 1 % (w/v) Bisacrylamid)	5 ml	660 μ l
1 M TRIS-HCl, pH 8,9	4,5 ml	-
1 M TRIS-HCl, pH 6,8	-	500 μ l
MilliQ-Wasser	2,2 ml	2,75 ml
20 % SDS-Lösung	60 μ l	20 μ l
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	10 μ l	5 μ l
12 % Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	100 μ l	50 μ l

3.4.3. Coomassieblau-Färbung von Proteinen auf SDS Gelen

Die Fixierung und Visualisierung von Proteinbanden auf den SDS-Gelen erfolgte durch den Farbstoff Coomassieblau. Die SDS-Gele wurden in der entsprechenden Färbelösung inkubiert und kurz in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden die Gele mit Entfärbelösung versetzt und bei Raumtemperatur bis zur vollständigen Entfärbung gewartet. Die so entfärbten Gele wurde mit dem Odyssey Sa Infrared Imaging System der Firma LI-COR gescannt und ausgewertet.

3.4.4. Aktivitätsbestimmung mittels AMC-Assay

a) Prinzip:

Dieser Assay beruht darauf, dass eine eingesetzte Deacetylase das synthetische Substrat Boc-Lys(TFA)-AMC oder Boc-Lys(Ac)-AMC deacetyliert. Anschließend hydrolysiert Trypsin die Peptidbindung zwischen dem Lysin und dem Aminomethylcoumarin (AMC). Durch die Hydrolyse entsteht freies AMC, welches nach Anregung bei 340 nm bei 460 nm fluoresziert und detektiert werden kann⁸². Bei Deacetylasen die nicht durch Trypsin verdaut werden, kann der Assay in einem Ein-Schritt-Assay erfolgen, bei dem der Anstieg der Fluoreszenz kontinuierlich detektiert wird. Als Maß für die Aktivität wird der Anstieg der Fluoreszenz im linearen Bereich herangezogen. Bei Deacetylasen die von Trypsin verdaut werden, muss die Reaktion in einem Zwei-Schritt-Assay durchgeführt werden. Hierbei wird die Reaktion nach einer gegebenen Zeitspanne durch Zugabe eines Inhibitors abgestoppt und Trypsin zugeben. Als Maß für die Aktivität dient in diesem Fall die umgesetzte Gesamtmenge (Endpunktmessung) an AMC. Die Reaktionsabfolge ist in Abbildung 13 dargestellt⁸².

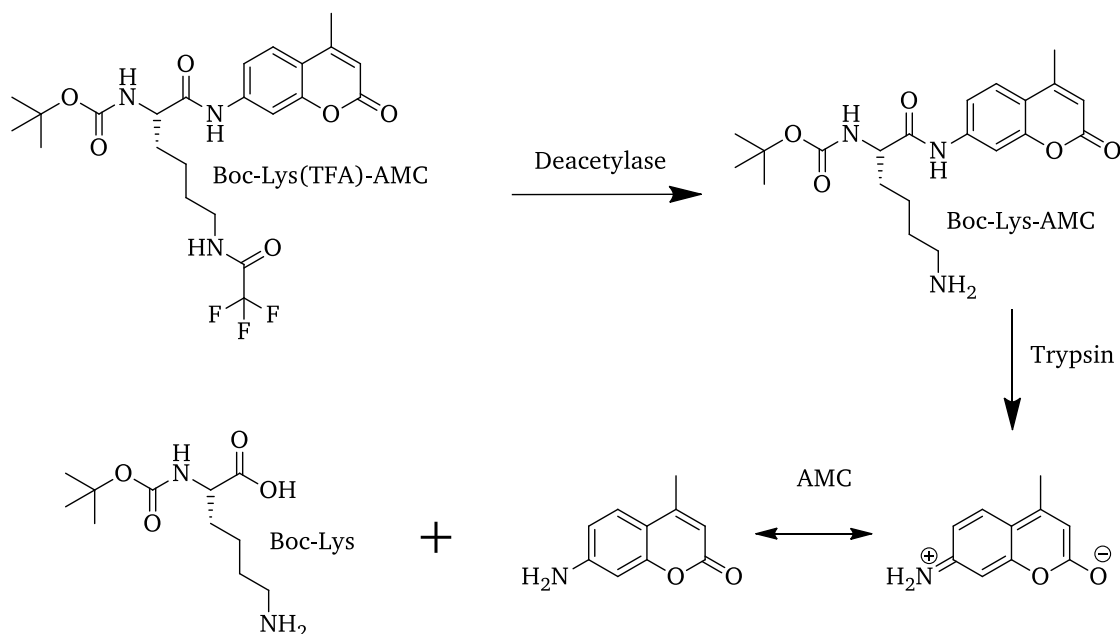


Abbildung 13: Reaktionsabfolge des AMC-Assays. Das Reaktionsschema ist Boc-Lys(TFA)-AMC als Substrat dargestellt, die Reaktion mit Boc-Lys(AC)-AMC erfolgt analog.

b) Durchführung zur Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter:

Die Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Dazu wurde die Substratkonzentration bei konstanter Enzymkonzentration variiert. In einer 96-Mikrotiterplatte wurde das Substrat seriell verdünnt vorgelegt und die Reaktion durch Zugabe des Enzyms (25-100 nM, Endkonzentration) und Trypsin (0,5 mg/ml, Endkonzentration) gestartet. Die Fluoreszenzzunahme wurde im Pherastar Plus Spektrometer detektiert und die Steigung mithilfe des Programms Excel ermittelt. Die Steigungen wurden in das Programm GraphPad Prism exportiert und durch der Gleichung

$$y = \frac{V_{max} \cdot x}{(K_M + x)} \quad [\text{Gl. 4}]$$

wurden V_{max} und K_M ermittelt.

Die vom Fluoreszenzspektrometer ausgegebenen **RFU**-Werte (*relative fluorescence units*) wurden über eine Kalibriergerade, mit definierten Mengen an Boc-Lys-AMC, in reelle katalytische Aktivitäten wie katal (mol/s) oder spezifische Aktivitäten katal/mg (Enzym) umgerechnet werden.

c) Bestimmung von IC_{50} -Werten:

Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte verschiedener Inhibitoren wurde eine serielle 1:2 oder 1:3 Verdünnungsreihe in AMC-Assay-Puffer vorgelegt (höchste Konzentration meist 35 μM oder 50 μM). Nach Zugabe der Enzymlösung in gewünschter Konzentration, erfolgte eine 30-minütige Inkubationsphase bei 37°C unter leichtem Schütteln, um ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Inhibitor herzustellen. Die Reaktion wurde durch Zugabe des jeweiligen AMC-Substrates gestartet und je nach Enzym in einem Ein-Schritt oder Zwei-Schritt-Assay durchgeführt. Die Berechnung des IC_{50} -Werte erfolgte durch das Programm GraphPad Prism unter zur Hilfenahme der Formel⁸³.

$$y = \frac{\text{Unteres Plateau} + (\text{Oberes Plateau} - \text{Unteres Plateau})}{1 + 10^{(\text{LogIC}_{50} - x) \cdot \text{HillSlope}}} \quad [\text{Gl. 5}]$$

Das obere Plateau stellt die Aktivität ohne Inhibitor da. Alle Messungen erfolgten mindestens als Triplikat.

3.4.5. Aktivitätsbestimmung mittels modifizierten Diaminoxidase-Assay

a) Prinzip:

Dieser Assay ermöglicht den Nachweis einer Deacetylierungsreaktion von Acetylcadaverin und Acetylputrescin. Am Ende der enzymgekoppelten Reaktion entsteht ein Farbkomplexes, der sich bei 498 nm photometrisch erfassen lässt. Der Assay wurde ursprünglich von Holt *et al.*⁸⁴ zum Nachweis der Aminoxidase-/Kupferaminoxidase-Aktivität entwickelt und später für Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAHs) modifiziert⁸⁵. In der modifizierten Variante wird die im ursprünglichen Assay enthaltene Monoaminoxidase durch eine Diaminoxidase ersetzt. Wird das eingesetzte Acetylpolyamin durch eine APAH deacetyliert, wird das entstehende Diamin durch eine Diaminoxidase unter Bildung von Wasserstoffperoxid, zu einem Aldehyd oxidiert. Das entstandene Wasserstoffperoxid oxidiert im weiteren Verlauf 4-Aminoantipyrin, welches mit Vanillesäure zu einem Quinoneimin-Farbstoff reagiert, der bei einer OD₄₉₂ detektierbar ist. Die Reaktionsabfolge des modifizierten Assays ist in Abbildung 14 dargestellt.

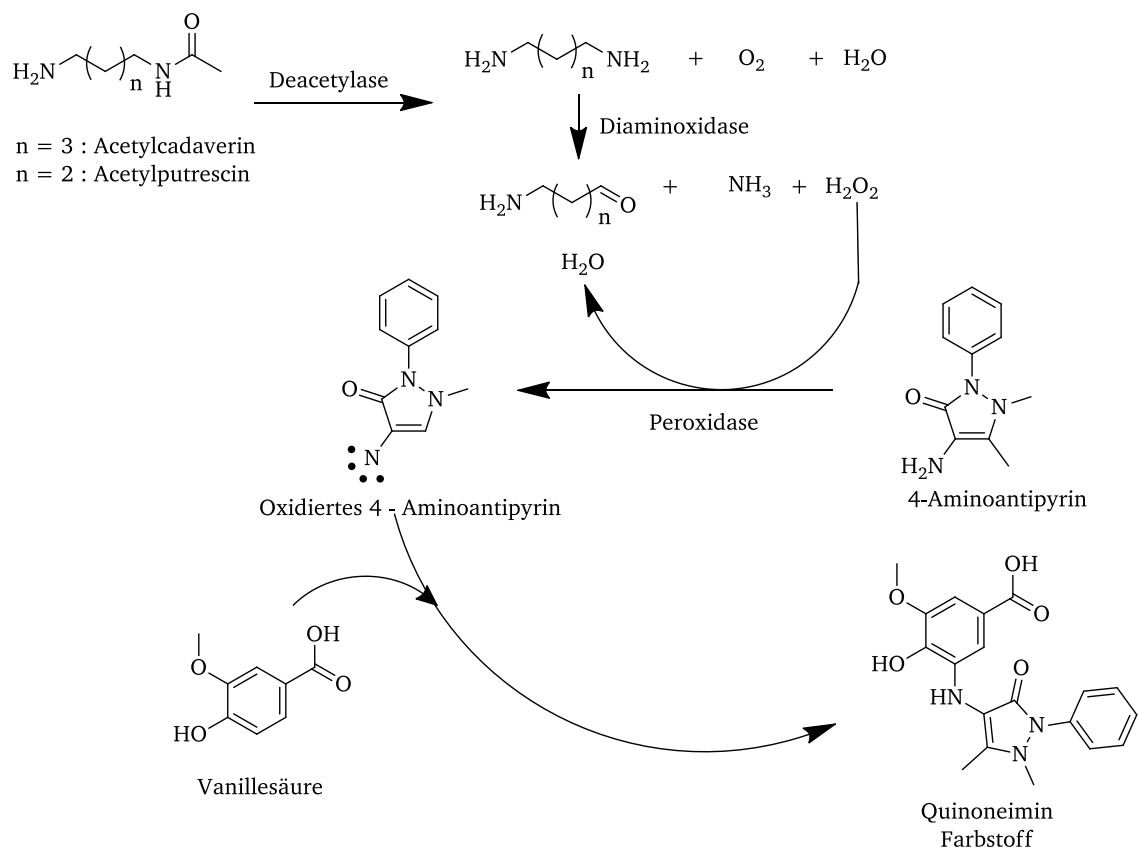


Abbildung 14: Reaktionsabfolge des Diaminoxidase-Assays.

b) Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter:

Die Berechnung der Michaelis-Menten-Parameter erfolgte analog der Auswertung des bereits beschriebenen AMC-Assays unter 3.5.4. Allerdings wurde hier ein modifiziertes Michaelis-Menten-Modell angenommen, welches eine Substratüberschusshemmung berücksichtigt.

$$y = \frac{V_{max} \cdot x}{KM + x \cdot (1 + x/Ki)} \quad [\text{Gl. 6}]$$

Es wurde eine serielle 1:2 Verdünnungsreihe des jeweiligen Polyamins im Diamin-Assay-Puffer vorgelegt, der zusätzlich die notwendigen Komponenten: 1 U/ml Diaminoxidase; 500 μM 4 - Aminoantipyrin; 4 U/ml Peroxidase; 1 mM Vanillesäure in konstanter Konzentration enthielten. Die Reaktion wurde anschließend mit 50-100 nM des jeweiligen Enzyms gestartet. Da auch ohne Deacetylase bereits ein Farbumschlag wahrnehmbar war, wurde parallel eine Blindprobe ohne Deacetylase bei jeweils gleichen Acetylpolyaminkonzentrationen erstellt und die erhaltenen Werte vom jeweils zugehörigen Wert mit Enzym abgezogen. Das Gesamtvolumen pro Kavität betrug 100 μl , alle angegebenen Konzentrationen stellen die resultierenden Endkonzentrationen dar. Die Messung erfolgte durch den TECAN Genius Spectra FLUOR Plus Reader über einen Zeitraum von 1^oh. Als Maß für die Aktivität wurde ausschließlich der lineare Bereich der Steigung herangezogen. Um die relative Aktivität in reelle Einheiten umzurechnen, wurde eine Kalibriergerade mit definierten Mengen an 4-Aminoantipyrin und einem leichten Überschuss an H_2O_2 erstellt.

3.4.6. Aktivitätsbestimmung mittels Acetat-Assay

a) Prinzip:

Dieser Assay stellt eine Modifizierung kommerziell erhältlicher Assay-Systeme dar. Die Abwandlung besteht darin, dass die notwendige Acetyl-CoA-Synthetase selbst hergestellt und frisch eingesetzt wird, was zu einer erhöhten Sensibilität führt⁸⁶. Anstatt acetylierter Histone werden hier die acetylierten Polyamine Acetylpolyamine N^1 -Acetylspermin, N^1 -Acetylspermidine, Acetylcadaverin und Acetylputrescin als Substrate verwendet. Das Prinzip beruht darauf, dass die Freisetzung von Acetat enzymatisch an die Entstehung von NADH gekoppelt wird, welches bei 460 nm spektroskopisch detektiert werden kann. Dabei werden Enzyme aus dem Citrat-Zyklus verwendet. Der Reaktionsablauf ist in Abbildung 15 dargestellt.

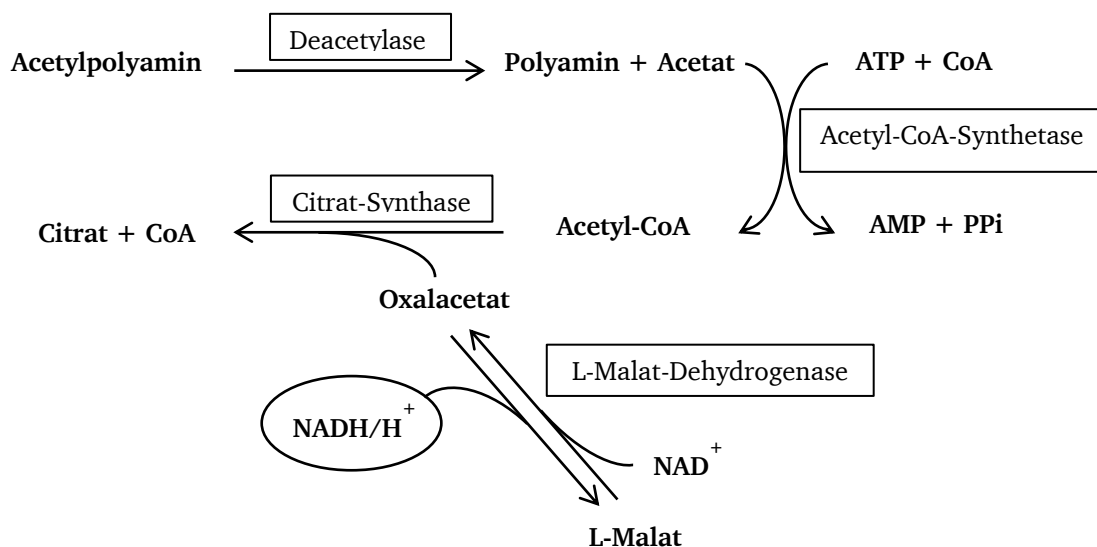


Abbildung 15: Reaktionsabfolge des Acetat-Assays.

b) Durchführung:

1,25 mM L-Äpfelsäure, 200 μ M ATP, 5 μ M NAD^+ , 15 μ M CoA, 0,02 U/ μ L Malat-Dehydrogenase, 0,04 U/ μ L Citrat-Synthase, 25 μ M Acetyl-CoA-Synthetase und 100 nM des gewünschten Enzyms wurden in Acetat-Assay-Puffer gelöst und einem PheraStar Fluorescence Spektrometer (BMG Labtech) bei 30°C so lange inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht einstellte (ca. 20-30 min). Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μ M des jeweiligen Acetylpolyamins gestartet. Das Gesamtvolumen pro Kavität betrug 100 μ l, alle angegebenen Konzentrationen stellen die resultierenden Endkonzentrationen dar. Um die relativen Aktivitäten in reelle Einheit umzurechnen, wurde eine Kalibriergerade mit definierten Mengen an NADH erstellt.

3.4.7. Aktivitätsbestimmung mittels Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays

Die Entwicklung dieses Fluoreszenzlebensdauer-Assays war Teil der Doktorarbeit und wurde bereits veröffentlicht⁸⁷. Die Evaluierung der Assay-Parameter findet sich daher im Ergebnisteil unter 4.5, die Theorie wurde in 1.5 diskutiert. Im Folgenden werden daher lediglich die finalen Parameter der Assay-Durchführung sowie die verwendeten Formeln zur Berechnung der Ergebnisse ausgeführt.

a) Bindungs-Assay und Berechnung der Dissoziationskonstante K_d :

Der Bindungsgrad der Enzyme an den DBD-Fluoreszenzliganden wurde durch Titration ermittelt. Dazu wurden 50 nM DBD-Sonde mit steigenden Konzentrationen des jeweiligen Enzyms titriert. Das finale Volumen betrug 60 μ l. Das Signal wurde in einem LF502 Nanoscan (Berthold Detection Systems GmbH Pforzheim, Germany) hinter einem 630-nm-Bandpass-Filter mit einem Durchlassbereich von 50 nm, nach einer Pulsanregung bei 456 nm aufgenommen. Für jede Probe wurde der Fluoreszenzzerfall für 50 ns detektiert. Der Bindungsgrad (B.D.) wurde wie folgt berechnet:

$$\text{B.D.} = \frac{A - A_{\min}}{A_{\max} - A_{\min}} \quad [\text{Gl. 7}]$$

mit A = Fluoreszenzlebensdauer (FLT) bei gegebener Enzymkonzentration
 A_{\min} = FLT ohne Enzym
 A_{\max} = FLT bei gesättigter Enzymkonzentration

Die Bindung des Liganden (L) an das Enzym wurde als einfache bimolekulare Interaktion betrachtet:



Befindet sich das System im Gleichgewicht gilt:

$$\text{B.D.} = \frac{[EL]}{[L]_0} = \frac{1}{2[L]_0} \left([E]_0 + [L]_0 + K_d - \sqrt{([E]_0 + [L]_0 + K_d)^2 - 4[L]_0[E]_0} \right) \quad [\text{Gl. 9}]$$

mit $[EL]$ = Gleichgewicht Protein-Ligand
 K_d = Dissoziationskonstante

b) Berechnung der inhibitorischen Konstante K_i :

Die Enzymkonzentration wurde so gewählt, dass der Bindungsgrad (B.D.) etwa 60-80 % betrug. Zur Bestimmung von K_i wurden 50 nM der Fluoreszenzsonde mit 1,5 μM PA1409, 0,75 μM PA0321 oder 0,47 μM PA3774 für 15 min inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zu steigenden Inhibitorkonzentrationen gegeben, für 30 min inkubiert und die FLT detektiert. Zur Berechnung der inhibitorischen Konstante K_i wurden die folgenden einfachen Kompetitionsmodelle angenommen.



Da der Inhibitor im hohem Überschuss im Vergleich zur Sonde eingesetzt wird gilt:

$$[\text{EL}] \ll [\text{EI}] + [\text{E}] \quad \Rightarrow \quad [\text{E}]_0 \approx [\text{EI}] + [\text{E}] \quad [\text{Gl. 11}]$$

daraus ergibt sich für B.D.:

$$\text{B.D.} = \frac{[\text{EL}]}{[\text{L}]_0} = \frac{1}{[\text{L}]_0} \left(\frac{[\text{L}]_0 [\text{E}]}{K_i + [\text{E}]} \right) \quad [\text{Gl. 12}]$$

mit

$$[\text{E}] = -\frac{1}{2} \cdot \left([\text{I}]_0 - [\text{E}]_0 + K_i - \sqrt{([\text{I}]_0 + [\text{E}]_0 + K_i)^2 + 4 \times [\text{I}]_0 \cdot [\text{E}]_0} \right) \quad [\text{Gl. 13}]$$

kann K_i ermittelt werden. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass bei Verwendung von Gleichung 12, K_i Werte die die Ligandenkonzentration unterschreiten nicht akkurat abgeleitet werden können. So ermittelte Werte geben daher nur eine obere Grenze für K_i an.

c) Umrechnung von IC_{50} -Werten in K_i -Werte:

IC_{50} -Werte lassen sich über die Cheng-Prusoff-Gleichung in K_i -Werte umrechnen. In dieser Arbeit wurde diese Gleichung angewendet um Daten aus verschiedenen Assay miteinander vergleichen zu können.

$$K_i = \frac{\text{IC}_{50}}{1 + \frac{[\text{S}]}{K_m}} \quad [\text{Gl. 14}]$$

mit S = Substratkonzentration
 K_m = Michaelis-Menten-Konstante

3.5. Kristallographische Methoden

3.5.1. Durchführung der Proteinkristallisation

Alle Kristallisationsversuche wurden nach dem *hanging-drop*-Prinzip durchgeführt.

- Initialscreens:

Um geeignete Kristallisationsbedingungen zu finden, wurden in erster Näherung sogenannte Initialscreens eingesetzt. Hierbei wurden 100 μl diverser vorgefertigter Screens in das Reservoir einer 96-Well Kristallisationsplatte (96W-KMTP) pipettiert. Anschließend wurde mit dem Pipettierroboter mosquito[®] LCP jeweils 400 nl dieser Reservoirflüssigkeit mit 400 nl der Proteinlösung vermischt und auf eine Klebefolie pipettiert. Anschließend wurde die Kristallisationsplatte mit der Klebefolie luftdicht verschlossen und bei 18 °C gelagert. Die verwendeten Screens sind in unter 2.5 aufgelistet.

- Feinscreens:

Erfolgreiche Bedingungen aus den Initialscreens wurden auf 24-well-*hanging-drop*-Platten weiter optimiert. Hierbei wurden die jeweils einzelnen Bestandteile der initialen Reservoirbedingung sukzessive in kleinen Schritten variiert, während die anderen Bestandteile konstant gehalten wurden. Proteinkonzentration sowie die Lagerungstemperatur wurden ebenfalls variiert. Die Tropfen bestanden aus 2 μl Proteinlösung und 2 μl Reservoirlösung.

- Protein-Ligand-Komplexe:

Um Protein-Ligand-Komplexe herzustellen, gibt es zwei Möglichkeiten. Die Erste besteht darin das Protein inklusive Inhibitor zu kristallisieren (Co-Kristallisation). Die Zweite ist zuerst das Protein zu kristallisieren und den Bindungspartner anschließend zuzugeben. Allgemein wird der Ligand in mindesten 10-fachen Überschuss zugegeben, um möglichst alle Bindungszentren zu besetzen. Dies ist aufgrund der teilweise geringen Löslichkeit der Liganden nicht immer möglich. Eine hohe Affinität ist meist von Vorteil. Allerdings können zu hohe Ligandenkonzentrationen die bereits gewachsen Kristalle auch (engl. *soaking*) schädigen. Letztlich hängt es vom individuellen Fall ab und muss ähnlich eines Feinscreens in mehreren Versuchen optimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich mit der *Soaking*-Methode die besten Resultate erzielen. Da sich die Kristalle als stabil erwiesen, wurden die Inhibitoren bis zur maximalen Löslichkeit in der Reservoirflüssigkeit gelöst und davon insgesamt 2 μ l in 0,5 μ l Schritten zeitlich versetzt zum Kristallisationstropfen pipettiert. Einzige Ausnahme bildete der PA3774-Acetat-Komplex. Aufgrund der hohen Löslichkeit von Acetat wurde hier eine Konzentration 50 mM Ammoniumacetat verwendet (ca. 320-facher Überschuss).

3.5.2. Datensammlung am Synchrotron

Zur Strukturbestimmung ausgewählte Kristalle mussten vor der Messung am Synchrotron gefriereschützt werden. Die Kristalle des Enzyms PA3774 wurden im viskosen Öl Paratone-N gewaschen. Die FB188-HDAH-Kristalle wurden dazu in einer Lösung bestehend aus 30 % PEG400, 0,1 mM Malat-Imidazol-Puffer pH 5,25 gewaschen. Alle Kristalle wurden anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dort bis zur Messung aufbewahrt. Alle Datensätze wurden an der Beamline PXII am Paul Scherrer Institut (SLS, Villigen, Schweiz) bei einer Temperatur von 100 K aufgenommen.

3.5.3. Strukturlösung, Verfeinerung und Visualisierung

Die gewonnenen Datensätze wurden mithilfe des Programms iMOSFLM⁸⁸ indiziert und integriert. Die Skalierung der Datensätze erfolgte mit dem Programm AIMLESS⁸⁹. Um das Phasenproblem zu lösen, konnte die Methode des molekularen Ersatzes unter zur Hilfenahme des Programms MOLREP⁹⁰ angewendet werden.

Da die Struktur des Enzyms FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* bereits bekannt war konnte ein Monomer aus der Struktur mit der PDB ID 1ZZ0⁹¹ als Modell verwendet werden.

Die Struktur des Enzyms PA3774 war unbekannt. Aufgrund der Sequenzähnlichkeit zu anderen bereits bekannten Proteinen der Histon-Deacetylase-Familie, konnte mit Hilfe des Programms SWISS-MODEL⁹² eine Strukturvorhersage berechnet werden, die ausreichend für eine erste Lösung des Phasenproblems war.

Für die Modellbildung wurde das Programm COOT⁹³ eingesetzt und nach jedem Zyklus mit REFMAC5⁹⁴ verfeinert. Die verwendeten Programme waren Teil des CCP4-Suits⁹⁵. Zur weiteren Analyse der Strukturen wurden die Onlineprogramme PDBsum⁹⁶, PISA⁹⁷ und ESPript 3.0⁹⁸. verwendet. Die Visualisierung der Strukturen erfolgte durch das Programm PyMOL⁹⁹.

4. ERGEBNISSE

4.1. Gentechnische Arbeiten

4.1.1. Umklonierung des Gens *pa0321*

Das Gen für die putative APAH *pa0321* wurde kodonoptimiert von der Firma Genscript bestellt und nach der in 3.1.3 beschriebenen Methode von einem pUC57-Vektor in den Expressionsvektor pET21a(+)-CPD umkloniert. N-terminal besaß das Gen die Schnittstelle *NdeI* und C-terminal die Schnittstelle *XhoI*. Der Zielvektor besaß das Gen *pa3774*, mit identischen Schnittstellen, welches erfolgreich durch *pa0321* ersetzt werden konnte.

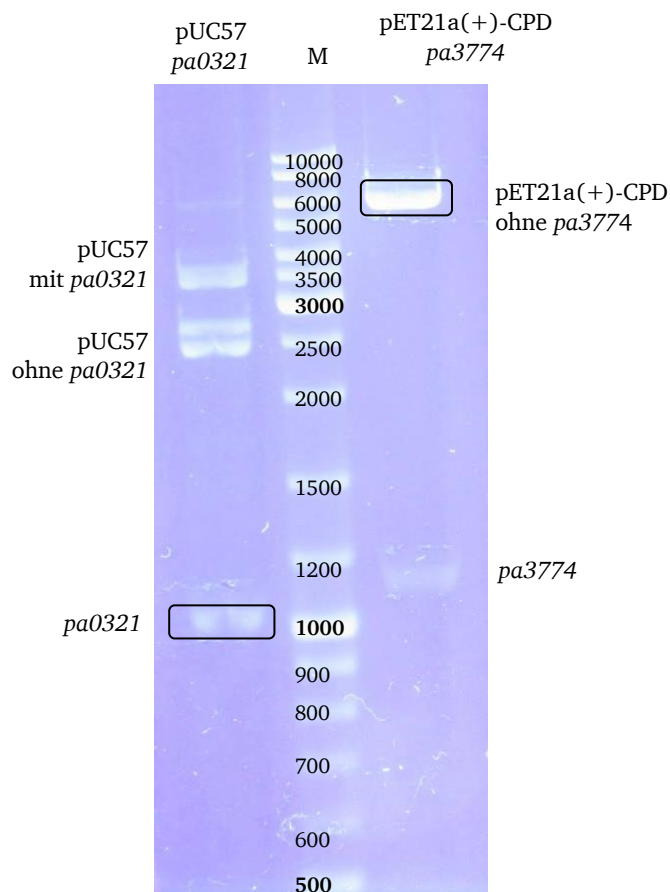


Abbildung 16: Präparatives Agarose-Gel der Umklonierung des Gens *pa0321*. Die Spur links des Markers zeigt den Verdau des pUC57-Vektors, die Spur rechts den Verdau des pET21a(+)-CPD-Vektors. Die umrandeten Genfragmente wurden anschließend ausgeschnitten und ligiert.

Abbildung 16 zeigt das präparative Agarose-Gel nach dem Verdau der beiden Plasmide mit den Restriktionsenzymen NdeI und XhoI. Der Expressionsvektor pET21a(+)-CPD ohne Geneinschub sollte ca. eine Größe von 6000 Nukleotiden, das Gen *pa3774* ca. 1150 Nukleotide aufweisen. Der pUC57-Vektor besitzt eine Größe von ca. 2700 Nukleotiden, das Gen *pa0321* ca. 1050 Nukleotide. Das Agarose-Gel deutet darauf hin, dass der Verdau zumindest des pUC57-Vektors nicht vollständig war. Die Menge an geschnittenen *pa0321* war dennoch ausreichend um sie mit dem geschnittenen Vektor pET 21a(+)-CPD-Vektor zu ligieren. Eine anschließende Sequenzierung zeigte, dass bei ca. der Hälfte der angewachsenen Klone das Gen korrekt eingebaut war. Die andere Hälfte wies noch das ursprüngliche Gen *pa3774* auf, was bedeutet das auch hier der Verdau nicht vollständig war.

4.1.2. Rückmutation des Gens *pa1409*

Das Gen *pa1409* wurde von einer befreundeten Arbeitsgruppe unter der Leitung von Andreas Schwienhorst in Göttingen in einem pQE70-MCS-Vektor bereitgestellt. In der Abschlussarbeit von J. Brod unserer Arbeitsgruppe wurde das Gen in den Expressionsvektor pET21a(+)-CPD umkloniert. Eine Sequenzanalyse ergab jedoch eine Punktmutation an der Stelle 971 (A anstatt G), was in einer Änderung der Aminosäure Glycin zu Asparagin resultiert wäre. Des Weiteren fehlten an der Stelle 89 und 90 zwei Nukleotide (GG), was eine fatale Leserasterverschiebung (*engl. Frameshift*) zur Folge hätte.

Mit den unter 2.7 angegebenen Primern und der unter 3.1.6 beschriebenen Methode wurde das Gen in die Wildtyp-Sequenz rückmutiert. Im ersten Schritt wurde die Deletion und im zweiten Schritt die Punktmutation korrigiert.

4.1.3. Mutationsstudie am Enzym PA3774

Auf Basis der vorgeschlagenen Mechanismen für diese Enzymfamilie^{17, 19, 20}, sind für die katalytische Aktivität entscheidende Aminosäuren identifiziert. Hierbei handelt es sich um die Seitenketten His143, His144 und Tyr313 (vgl. Abbildung 3). Diese sind in den HDAC-Klassen I und IIb hochkonserviert, in der Klasse IIa befindet sich ein Histidin an der Stelle des Tyrosins.

Die spezifischen Einflüsse der jeweiligen Seitenketten auf die Enzymaktivität sollten durch Einzelmutationen überprüft werden. Zusätzlich sollten dadurch inaktive Mutanten für eine Röntgenstrukturanalyse erzeugt werden, die es ermöglichen potenziell natürliche Substrate an das Enzym zu binden. Die beiden Histidine 143 und 144 wurden durch Alanine ersetzt. Das Tyrosin 313 wurde zum einen durch das nicht katalytisch aktive Phenylalanin und zum anderen durch Histidin ersetzt, um es mit Enzymen der Klasse IIa vergleichen zu können.

Die Mutationen erfolgten mit der unter 3.1.6 beschriebenen ortsspezifischen Mutagenese und mit den unter 2.7 angegebenen Primern.

Die Aktivitäten der reinen Proteine wurden mithilfe des AMC-Assays und den Substraten Boc-Lys(Ac)-AMC sowie Boc-Lys(TFA)-AMC bestimmt. Die relativen Aktivitäten sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Relative Aktivitäten der PA3774-Mutanten.

Mutante	Boc-Lys(TFA)-AMC	Boc-Lys(Ac)-AMC
Wildtyp	100 ± 2	100 ± 4
H143A	1,0 ± 0,1	≤ 0,05*
H144A	1,4 ± 0,1	≤ 0,05*
Y313F	98 ± 3	≤ 0,05*
Y313H	85 ± 3	≤ 0,05*
*Untere Nachweisgrenze		

Die Einzelmutanten bestätigen die essenzielle Rolle dieser Seitenketten für die Katalyse. Eine weiterführende Interpretation der Ergebnisse findet sich in Abschnitt 5.3. Zusätzlich konnten auch die Strukturen der Mutanten H143A und Y313F aufgeklärt werden. Diese Ergebnisse finden sich in Abschnitt 4.9.5.

4.2. Proteinreinigungen

4.2.1. Reinigung des Enzyms PA3774 und dessen Mutanten

Das rekombinant produzierte Fusionsprotein PA3774 sowie alle Einzelmutanten wurden nach der unter 3.3.2 beschriebenen Methode exprimiert und die Zellen nach 3.3.4 aufgeschlossen. Im Folgenden werden exemplarisch die Einzelschritte der Reinigung gezeigt.

- **Affinitätschromatographie:**

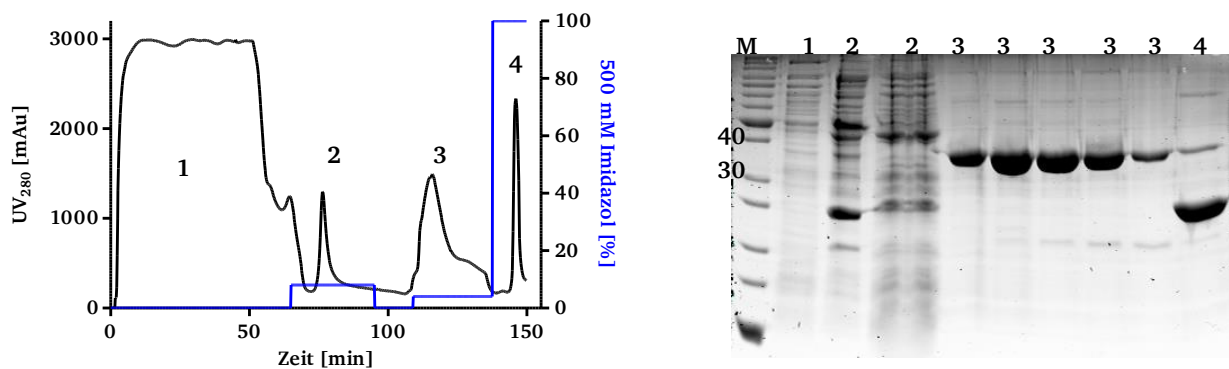


Abbildung 17: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA3774. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. M = Marker (Angaben in kDa), 1 = Durchfluss, 2 = Vorelution mit 60 mM Imidazol, 3 = Elution mit 50 µM Phytinsäure, 4 Elution mit 500 mM Imidazol entspricht 100% Puffer B.

Das Chromatogramm bestätigte die gewünschten Vorteile des verwendeten Cystein-Protease-Domäne-Systems (CPD). Nach Induktion der CPD mit Phytinsäure (Peak 3) wurde das Zielprotein in großer Reinheit und Tag-frei eluiert. Das Protein wies erwartungsgemäß eine Größe von ca. 40 kDa auf (mit 3 gekennzeichneten Fraktionen in der SDS-PAGE). Die CPD mit ca. 22 kDa blieb zunächst an der Säule gebunden und wurde erst nach Erhöhung der Imididazolkonzentration eluiert (Peak 4, mit 4 gekennzeichneten Fraktionen der SDS-PAGE).

- **Größenausschlusschromatographie:**

Da für Kristallisationsexperimente eine hohe Reinheit des Proteins erforderlich ist, wurde als letzter Reinigungsschritt eine Größenausschlusschromatographie durchgeführt. Dies sollte letzte Unreinheiten, Proteinaggregate, sowie die sich im Eluat befindliche Phytinsäure entfernen.

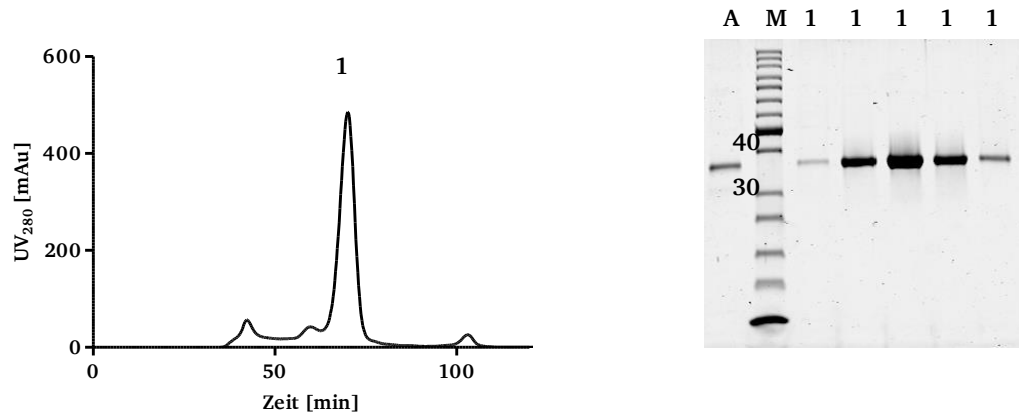


Abbildung 18: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA3774. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. A = Auftrag auf die Säule M = Marker, 1 = Elution Zielprotein.

Abbildung 18 zeigt das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie. Die sauberen Proteinfraktionen wurden vereint und auf mindestens 6 mg/ml konzentriert. Um der Aggregation des Proteins durch unspezifische Disulfidbrückenbildung vorzubeugen, wurde das milde aber lang anhaltende Reduktionsmittel Tris(2-carboxyethyl)phosphin (TCEP) in einer Konzentration von 2 mM zugesetzt. Nach der Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff wurde das Protein bei -20 °C aufbewahrt. Im Durchschnitt wurden aus ca. 20 g Zellmasse ca. 15-20 mg hochreines Protein ($\geq 98\%$) gewonnen.

4.2.2. Reinigung des Enzyms PA0321

Die Reinigung des Proteins PA0321 erfolgte analog der Reinigung von PA3774.

- **Affinitätschromatographie:**

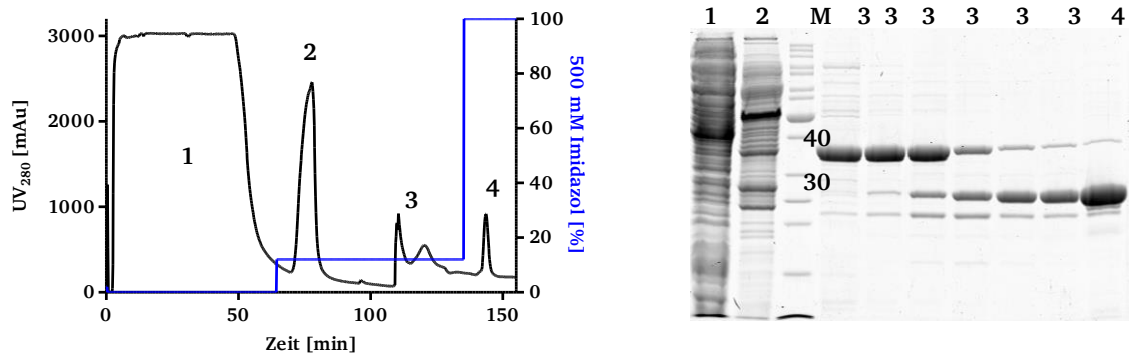


Abbildung 19: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA0321. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. M = Marker, 1 = Durchfluss, 2 = Vorelution mit 60 mM Imidazol, 3 = Elution mit 50 μ M Phytinsäure, 4 Elution mit 500 mM Imidazol entspricht 100 % Puffer B.

Das Protein besitzt eine Größe von ca. 39 kDa und befand sich erwartungsgemäß im Eluat der Phytinsäure. Des Weiteren fanden sich zwei größere Verunreinigungen mit ca. 25 und 22 kDa. Diese konnten jedoch mithilfe der Größenausschlusschromatographie erfolgreich vom Zielprotein separiert werden.

- **Größenausschlusschromatographie:**

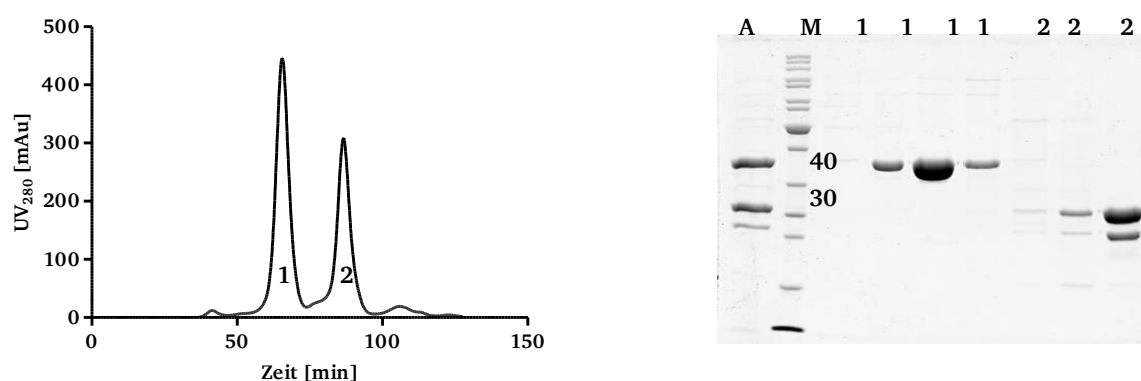


Abbildung 20: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA0321. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. A = Auftrag auf die Säule M = Marker, 1 = Elution Zielprotein, 2 Elution Verunreinigungen.

Die reinen Fraktionen wurden vereint und konzentriert. Die Ausbeuten betrugen ca. 1 mg pro eingesetzten Gramm Zellmasse. Vor der Schockgefrierung wurde 2 mM TCEP zugegeben.

4.2.3. Reinigung des Enzyms PA1409

Die Reinigung des Proteins PA1409 erfolgte analog der Reinigung von PA3774 und PA0321. Die erhaltenen Ausbeuten und Reinheit waren vergleichbar.

- **Affinitätschromatographie:**

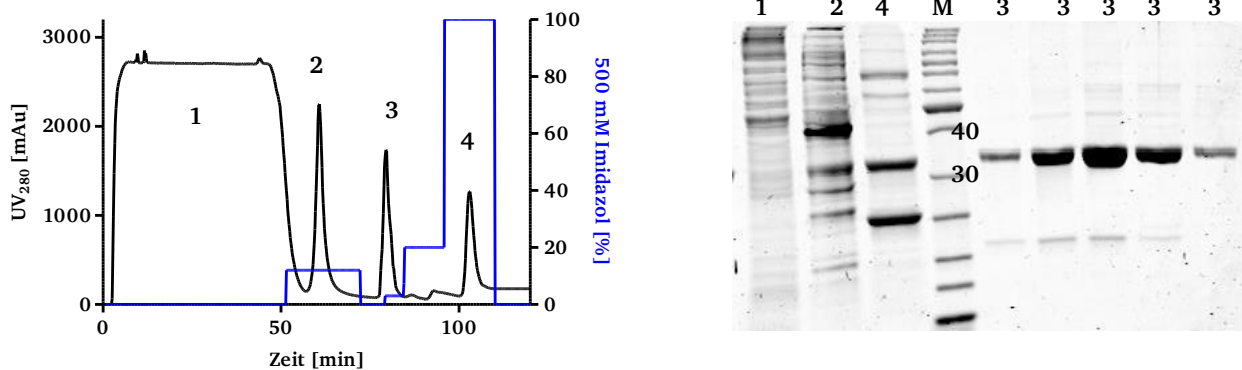


Abbildung 21: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA1409. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. M = Marker, 1 = Durchfluss, 2 = Vorelution mit 60 mM Imidazol, 3 = Elution mit 50 µM Phytinsäure, 4 Elution mit 500 mM Imidazol entspricht 100 % Puffer B.

- **Größenausschlusschromatographie:**

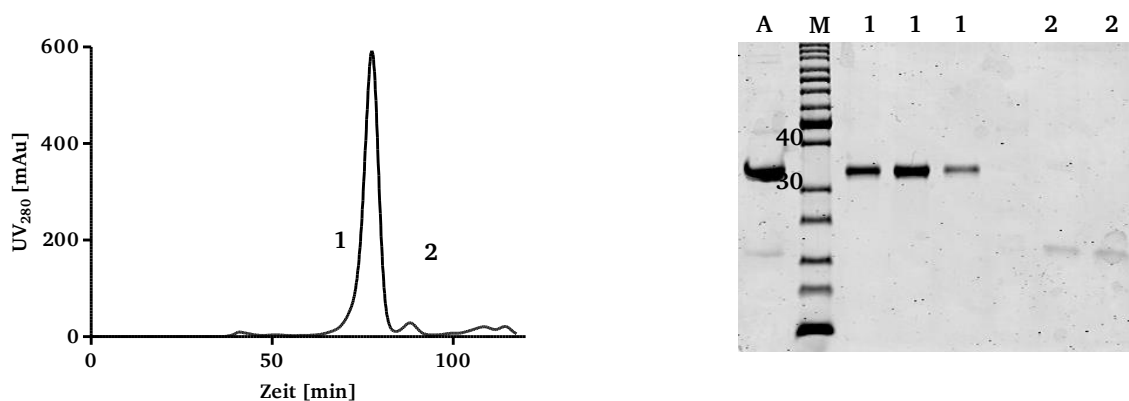


Abbildung 22: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA1409. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. A = Auftrag auf die Säule M = Marker, 1 = Elution Zielprotein, 2 Elution Verunreinigungen.

4.2.4. Reinigung der FB188-HDAH

Die Reinigung der rekombinant produzierten FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* wurde ähnlich den bereits beschriebenen Proteinen durchgeführt, allerdings besaß das Protein N-Terminal einen Hexahistidin-Tag und keine CPD-Domäne und wurde daher mit einem Imidazolgradienten eluiert. Wie die Abbildung 23 zeigt, wurde das Protein in hoher Menge produziert und besaß bereits nach der Affinitätschromatographie eine hohe Reinheit ($\geq 95\%$). Die höchste Absorption wurde bei einer Imidazolkonzentration von ca. 190 mM erreicht.

- **Affinitätschromatographie:**

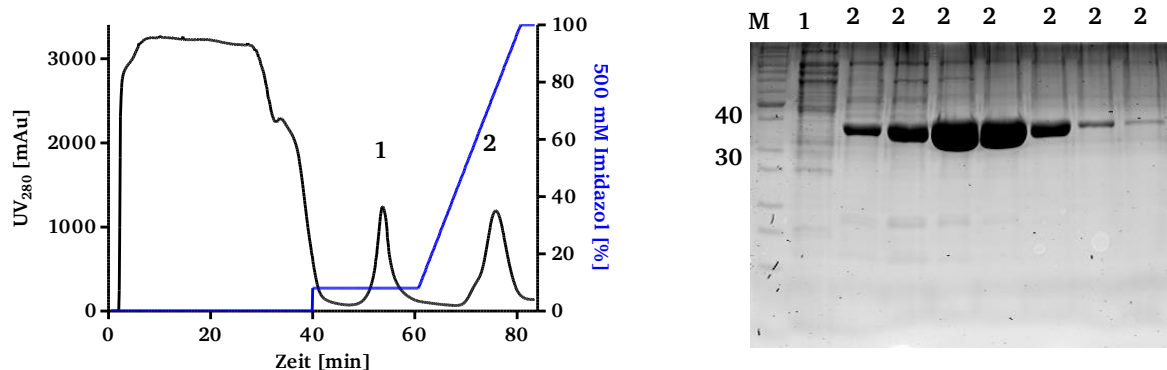


Abbildung 23: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie der FB188-HDAH. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. M = Marker, 1 = Vorelution mit 60 mM Imidazol, 2 = Elution des Zielproteins durch Imidazolgradienten.

- **Größenausschlusschromatographie:**

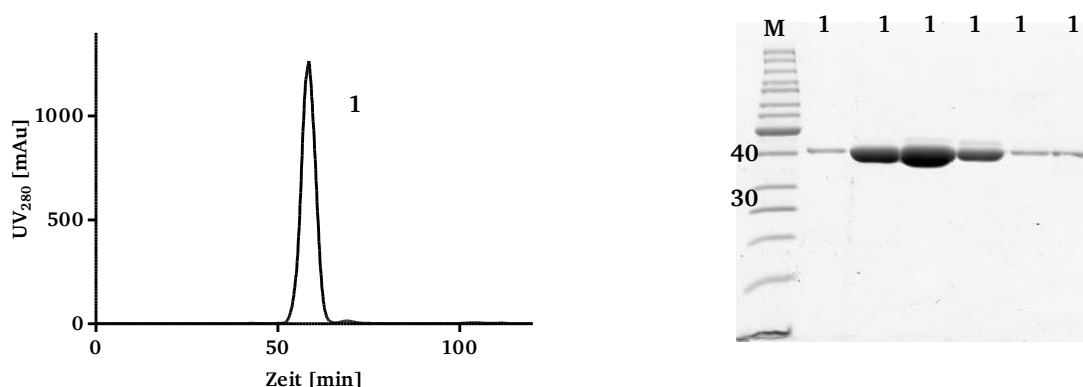


Abbildung 24: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie der FB188-HDAH. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. A = Auftrag auf die Säule M = Marker, 1 = Elution Zielprotein, 2 Elution Verunreinigungen.

Die reinen Fraktionen wurden vereint und konzentriert. Analog zu den anderen Deacetylasen wurde 2 mM TCEP vor der Lagerung zugegeben. Aus ca. 20 g Zellmasse konnten im Durchschnitt 25-30 mg hochreines Protein ($\geq 98\%$) gewonnen werden. Die Ausbeute pro Gramm Zellen war etwas höher als bei den drei Deacetylasen aus *P. aeruginosa*.

4.2.5. Reinigung der Acetyl-CoA-Synthetase

Für den unter 3.4.6 beschriebenen Acetat-Assay war es nötig die verwendete Acetyl-CoA-Synthetase (ACS) (ursprünglich aus *Salmonella enterica*¹⁰⁰) selbst herzustellen, um die notwendige Sensibilität des Assays zu gewährleisten⁸⁶. Das dafür notwendige Vektorkonstrukt war ein freundliches Geschenk von Carol A. Fierke (Michigan University, USA), die diesen Assay in ihre Gruppe etabliert hatte. Der Vektor wurde nach der in 3.1.5 beschriebenen Methode in *E. Coli* BL21(DE3) transformiert. Das Protein besaß C-terminal einen Hexahistidin-Tag und wurde via Affinitätschromatographie und Größenausschlusschromatographie gereinigt.

- **Affinitätschromatographie:**

Die Affinitätschromatographie wurde ähnlich wie bei den Deacetylasen durchgeführt. Da keine Erfahrungswerte vorlagen, wurde auf eine Vorelution mit 80 mM Imidazol verzichtet. Die Imidazolkonzentration betrug allerdings während des Auftrages konstant 20 mM, um unspezifischen Bindungen vorzubeugen. Das Chromatogramm zeigte einen einzelnen Peak mit einer hohen Absorption von ca. 2200 mAu, nachdem die Elution mittels Imidazolgradienten gestartet wurde. Die SDS-PAGE bestätigte, dass das Zielprotein (Größe ca. 73 kDa) in hoher Menge produziert wurde. Allerdings beinhaltete die Hauptelution eine große Anzahl an Verunreinigungen verschiedener Größen. Die äußerst breiten Banden zeigen deutlich, dass die SDS-PAGE mit Protein überladen war.

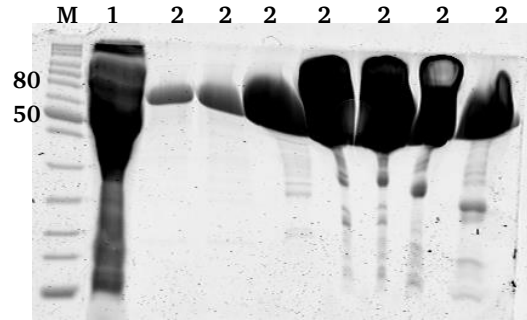
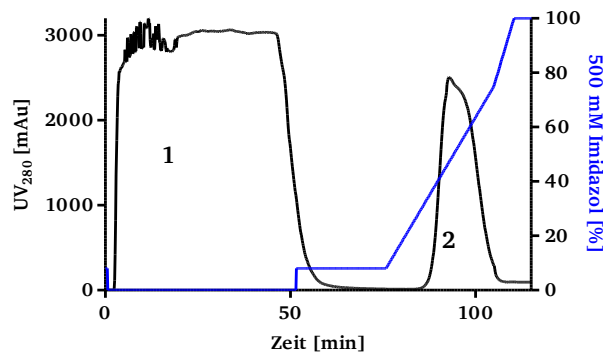


Abbildung 25: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie der ACS. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. M = Marker, 1 = Durchfluss der Säule, 2 = Elution durch Imidazolgradienten.

- **Größenausschlusschromatographie:**

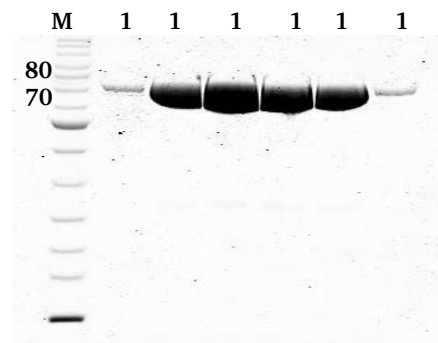
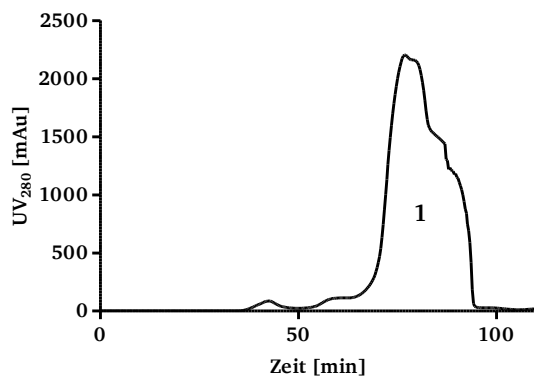


Abbildung 26: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie der ACS. Die Nummerierung der Peaks links entspricht dem Auftrag der SDS-PAGE rechts. A = Auftrag auf die Säule M = Marker, 1 = Elution der Hauptfraktion

Durch die anschließende Größenausschlusschromatographie gelang es das Protein in einer Reinheit $\geq 98\%$ zu erhalten. Der Peak des Chromatogramms wies zwar eine Schulter auf, jedoch ließen die Fraktionen der SDS-PAGE darauf schließen, dass es sich hierbei um verschiedene oligomere Zustände der ACS handelte, da sonst keine nennenswerten Verunreinigungen zu erkennen waren. Das Protein wurde auf ca. 120 mg/ml konzentriert. Aus ca. 20 g Zellmasse konnten ca. 160 mg Protein gewonnen werden.

4.3. Untersuchungen der Enzymkinetik mittels verschiedener Assays

4.3.1. Bestimmung der Michaelis-Menten-Parameter durch AMC-Assay

Der unter 3.4.4 beschriebene AMC-Assay erlaubt eine einfache und schnelle Bestimmung der Deacetylase-Aktivität und wurde zum Standard für diese Enzymfamilie. Als artifizielle Substrate dienen Boc-Lys(Ac)-AMC sowie Boc-Lys(TFA)-AMC. Das Boc-Lys(TFA)-AMC ist die trifluoracetylierte Variante des Boc-Lys(Ac)-AMC und kommt hauptsächlich bei HDACs der Klasse IIa zum Einsatz, da diese nur geringe Aktivität gegenüber Boc-Lys(Ac)-AMC zeigen.

Für die bakteriellen Enzyme wurden die Michaelis-Menten-Parameter (MM) für jeweils beide Substrate bestimmt. Die erhaltenen Kinetiken sind in Abbildung 27 gezeigt und daraus abgeleiteten Parameter in Tabelle 8 zusammengefasst. Für die Enzyme PA3774 und HDAH sind zusätzlich die Literaturwerte aus Riester *et al.* angegeben⁷⁵. Der Vergleich zeigt eine gute Übereinstimmung der K_M -Werte, jedoch lagen die hier bestimmten spezifischen Aktivitäten speziell bei PA3774 deutlich höher. Grund hierfür könnten die unterschiedlichen Puffersysteme sein. In der betreffenden Studie wurde Phosphatpuffer verwendet, wohingegen in dieser Arbeit Tris-HCL zum Einsatz kam. Analog wurde in Vorversuchen eine deutlich verringerte Aktivität von PA3774 in Phosphatpuffer festgestellt.

Das Enzym PA0321 zeigte keine signifikante Aktivität gegenüber Boc-Lys(Ac)-AMC, die anderen Enzyme setzten jeweils beide Substrate um.

Bei Betrachtung der MM-Kinetiken fällt auf, dass bei FB188-HDAH und PA3774, im Rahmen der Löslichkeit der beiden Substrate, das Plateau von V_{max} annähernd erreicht wird, während PA0321 und PA1409 weit davon entfernt sind. Die angegebenen Werte stellen daher eine Extrapolation des Programms GraphPad Prism dar und sind unter gewissem Vorbehalt zu betrachten.

Tabelle 8: Michaelis-Menten-Parameter bestimmt durch AMC-Assay.

Enzym	MM-Parameter	Boc-Lys(Ac)-AMC	Boc-Lys(TFA)-AMC
PA0321	V_{max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	^a	11 ± 1
	K_M [μM]	^a	96 ± 14
PA1409	V_{max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	1,3 ± 0,1	5,2 ± 0,6
	K_M [μM]	223 ± 12	84 ± 15
PA3774	V_{max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	3,3 ± 0,1 / (0,53 ± 0,04) ^b	8,1 ± 0,2 / (0,63 ± 0,04) ^b
	K_M [μM]	95 ± 7 / (57,7 ± 13,8) ^b	21 ± 1 / (6,3 ± 0,3) ^b
HDAH	V_{max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	0,43 ± 0,02 / (0,14 ± 0,02) ^b	0,22 ± 0,01 / (0,14 ± 0,01) ^b
	K_M [μM]	26 ± 4 / (14 ± 3) ^b	7,0 ± 0,8 / (39 ± 8) ^b

^a kein Umsatz

^b Literaturwerte aus Riester *et al.*⁷⁵

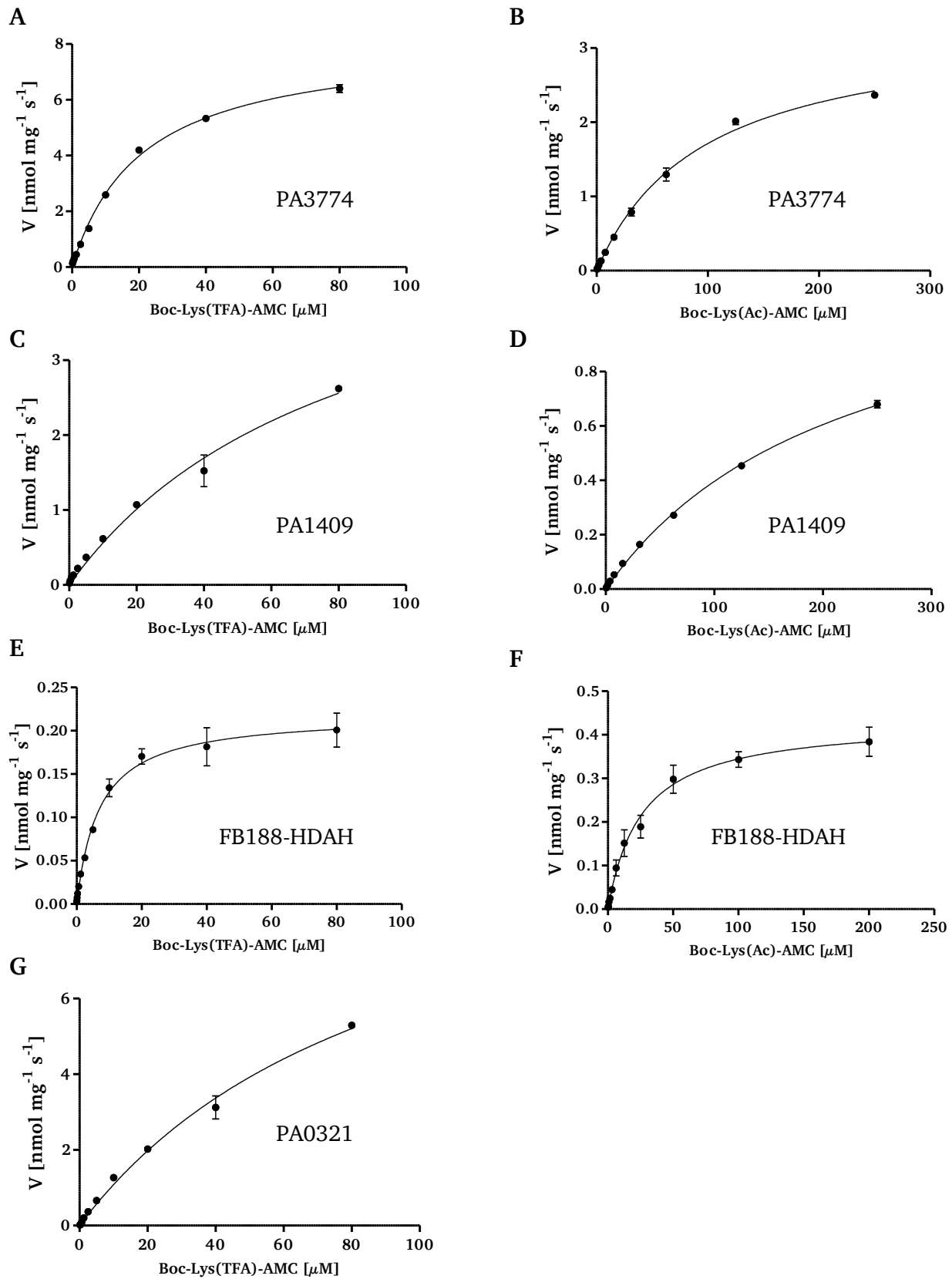


Abbildung 27: Michaelis-Menten-Bestimmung durch AMC-Assay. Boc-Lys(Ac)-AMC (rechte Seite), Boc-Lys(TFA)-AMC (linke Seite). **(AB)** PA3774, **(CD)** PA1409, **(EF)** FB188-HDAH, **G** PA0321. Boc-Lys(TFA)-AMC hat eine maximale Löslichkeit von 100 μ M.

4.3.2. Bestimmung der Michealis-Menten-Parameter durch Diaminoxidase-Assay

Mithilfe des modifizierten Diaminoxidase-Assays^{85, 101} ist es möglich, die Michealis-Menten-Parameter der kurzkettigen Acetylpolyamine Acetylcadaverin und Acetylputrescin zu bestimmen. Der Assay wurde nach 3.4.5 durchgeführt und ausgewertet.

Es stellte sich heraus, dass die beiden putativen Acetylpolyamin-Amidohydrolasen PA0321 und P1409 in der Lage waren, beide Substrate umzusetzen. Die Enzyme PA3774 und FB188-HDAH zeigten im Gegensatz dazu keinen nennenswerten Umsatz.

Mit Ausnahme von PA0321 und Acetylputrescin als Substrat wurden bei hohen Substratkonzentrationen die Umsatzraten wieder langsamer. Die ermittelten Werte stehen dabei sehr gut einem modifizierten Michaelis-Menten-Modell im Einklang, welches eine Substratüberschusshemmung berücksichtigt. Beide Enzyme setzten Acetylputrescin schneller um als Acetylcadaverin. PA1409 erwies sich bei beiden Substraten als das aktivere Enzym. Die Michaelis-Menten-Kinetik inklusive Substratinhibierung ist in Abbildung 28 dargestellt und die ermittelten kinetischen Parameter sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

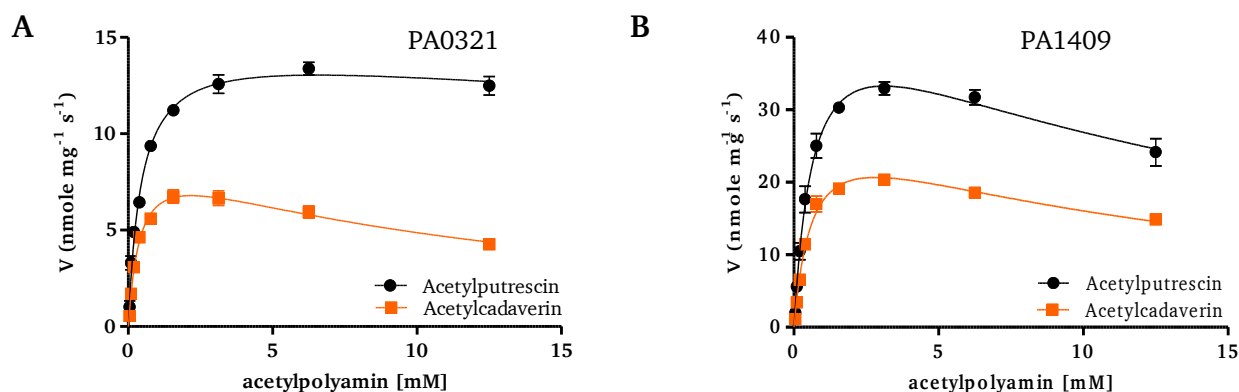


Abbildung 28: Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt durch den Diaminoxidase Assay. (A) PA0321 (B) PA1409. Bei höheren Substratkonzentrationen ist teilweise eine Substratüberschusshemmung zu beobachten.

Tabelle 9: Michaelis-Menten-Parameter bestimmt durch Diaminoxidase-Assay.

Enzym	MM-Parameter	Acetylputrescin	Acetylcadaverin
PA0321	V_{\max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	15 ± 1	9,4 ± 0,7
	K_M [μM]	452 ± 77	422 ± 69
	K_i [mM]		11 ± 2
PA1409	V_{\max} [nmol mg ⁻¹ s ⁻¹]	48 ± 4	34 ± 3
	K_M [μM]	707 ± 108	652 ± 82
	K_i [mM]	14 ± 3	12 ± 2

4.3.3. Halbqualitativer Nachweis des Acetylpolyamin-Umsatzes mittels Acetat-Assay

Der unter 3.4.6 beschriebene Acetat-Assay erlaubt einen Nachweis aller Deacetylase-Substrate, weil der Umsatz an die Freisetzung von Acetat gekoppelt wird.

Es wurden die natürlich vorkommenden Acetylpolyamine N¹-Acetylspermin, N¹-Acetylspermidine, Acetylcadaverin und Acetylputrescin als potenzielle Substrate untersucht. Abbildung 29 zeigt die Messung des Umsatzes der Acetylpolyamine durch die Enzyme PA0321 sowie PA1409. In Tabelle 10 sind neben den spezifischen Aktivitäten aus der Messung zusätzlich die Ergebnisse aus dem Diaminoxidase-Assay bei gleicher Substratkonzentration angegeben. Der Vergleich zeigt eine gute Übereinstimmung der beiden unabhängigen Assays. Das Enzym PA1409 war in der Lage alle getesteten Substrate umzusetzen. Das Enzym PA0321 konnte lediglich die kurzkettigen Acetylpolyamine Acetylcadaverin und Acetylputrescin metabolisieren. Die Enzyme PA3774 und FB188-HDAH zeigten keinen signifikanten Umsatz.

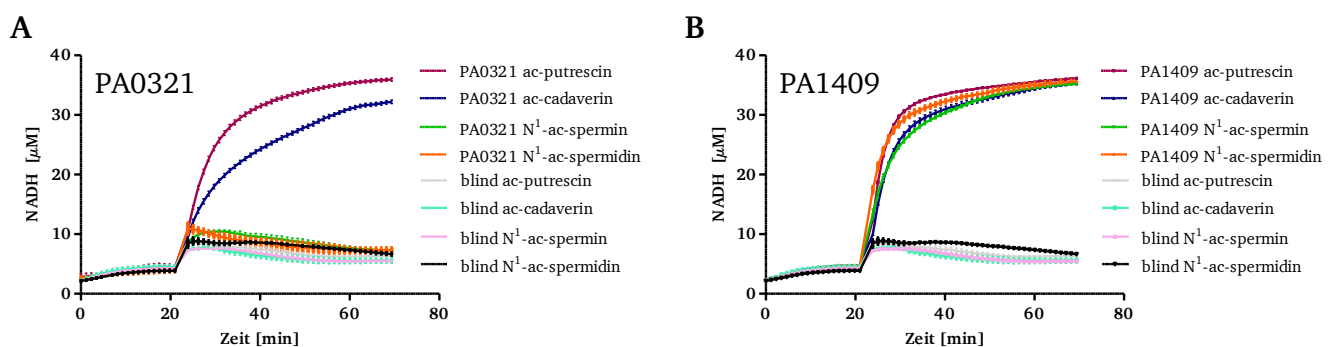


Abbildung 29: Ergebnisse des Acetat-Assays. Nach Erreichen des Gleichgewichtes (ca. 23 min) wurden die angegebenen acetylierten Polyamine (200 µM) zu den Enzymen (A) PA0321 und (B) PA1409 zugegeben. Zusätzlich sind die Negativkontrollen ohne Enzym dargestellt.

Tabelle 10: Spezifische Aktivität bestimmt durch Acetat-Assay.

Enzym	Assay	spezifische Aktivität in nmol mg ⁻¹ s ⁻¹ bei 200 µM Substrat			
		Acetylputrescin	Acetylcadaverin	N ¹ -Acetylspermin	N ¹ -Acetylspermidin
PA0321	Acetat	4,9 ± 0,2	2,9 ± 0,1	a	a
	Diaminoxidase	4,9 ± 0,3	3,1 ± 0,3	b	b
PA1409	Acetat	10,2 ± 0,1	11,1 ± 0,3	7,4 ± 0,1	7,2 ± 0,2
	Diaminoxidase	10,5 ± 1,6	6,5 ± 1,0	b	b

^a Umsatz nicht von Blindprobe unterscheidbar

^b Substrat inkompatibel mit Diaminoxidase -Assay

4.4. IC₅₀-Bestimmungen photoschaltbarer Inhibitoren auf die HDAC-Familie

Die inhibitorische Wirkung der unter 1.4 vorgestellten photoschaltbaren Azobenzol- und Arylazopyrazol-Derivate wurde für die bakteriellen Enzyme PA3774, PA0321, PA1409 und FB188-HDAH sowie die menschlichen HDAC1, HDAC2, HDAC3, HDAC6 und HDAC8 untersucht. Alle Inhibitoren wurden von Claire E. Weston vom Imperial College London bereitgestellt. Um die Effizienz der Photoschaltung beurteilen zu können, wurden für die Azobenzol-Derivate zusätzlich Stilben-Derivate als Referenzsubstanzen synthetisiert (Abbildung 30). Bei diesen Verbindungen findet in Dunkelheit und bei Raumtemperatur keine thermische Relaxation von *cis*-Konfiguration in die *trans*-Konfiguration statt¹⁰².

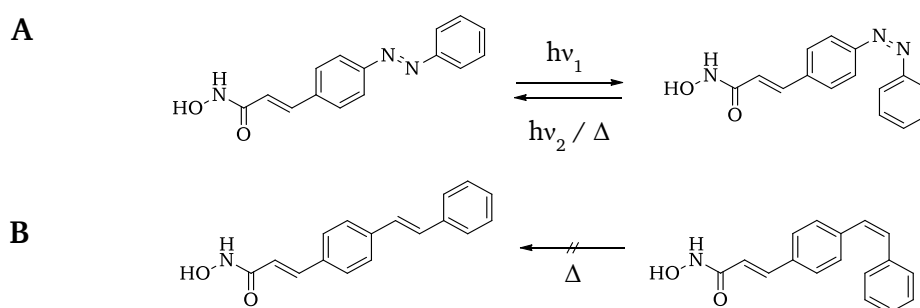


Abbildung 30: Vergleich zwischen Inhibitoren und Referenzsubstanzen. Die Abbildung zeigt das Prinzip der Referenzsubstanzen am Beispiel von CEW65. Während sich das Azobenzol-Derivat zwischen der *cis* und *trans*-Konfiguration durch Bestrahlung schalten lässt (**A**), ist die Referenzsubstanz bei Raumtemperatur und Dunkelheit stabil (**B**).

Die ermittelten IC₅₀-Werte sind nach Inhibitoren (Azobenzol- oder Arylazopyrazol-Derivate) und Enzymen (menschliche oder bakterielle) unterteilt und werden in den folgenden Unterkapiteln separat ausgeführt.

4.4.1. IC₅₀-Bestimmungen der Arylazopyrazol-Derivate auf bakterielle HDACs

Tabelle 11 zeigt die ermittelten IC₅₀-Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf die bakteriellen HDACs.

Tabelle 11: Ermittelte IC₅₀-Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf bakterielle HDAC-Enzyme in μM .

Inhibitor	HDAH	PA3774	PA0321	PA1409
CEW395 <i>trans</i>	$0,14 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,29 \pm 0,03$	$0,53 \pm 0,03$
CEW395 <i>cis</i>	$0,20 \pm 0,02$	$0,09 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,27 \pm 0,09$
Differenz	< 2-fach	< 2-fach	< 2-fach	2-fach
CEW416 <i>trans</i>	$0,08 \pm 0,01$	$0,08 \pm 0,01$	$0,50 \pm 0,03$	$0,76 \pm 0,07$
CEW416 <i>cis</i>	$0,28 \pm 0,03$	$0,11 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,02$	$0,13 \pm 0,01$
Differenz	3-fach	< 2-fach	2-fach	5-fach
CEW454 <i>trans</i>	$0,11 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,01$	$0,22 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,09$
CEW454 <i>cis</i>	$0,31 \pm 0,06$	$0,19 \pm 0,02$	$0,10 \pm 0,01$	$0,14 \pm 0,01$
Differenz	3-fach	3-fach	2-fach	6-fach

Wie der Tabelle 11 zu entnehmen ist, zeigen alle Arylazopyrazol-Derivate ein starkes Inhibitionsverhalten. Wie theoretisch zu erwarten ist, wird der Unterschied zwischen den beiden Konfigurationen mit zunehmend voluminöserem Rest ausgeprägter. Bei den Enzymen FB188-HDAH und PA3774 inhibiert das Molekül in seiner *trans*-Konfiguration stärker als in seiner *cis*-Konfiguration, wobei die Unterschiede gering sind. Bei den Enzymen PA0321 sowie PA1409 ist es umgekehrt. Beim Enzym PA1409 sind die deutlichsten Unterschiede zwischen den beiden Konfigurationen erkennbar.

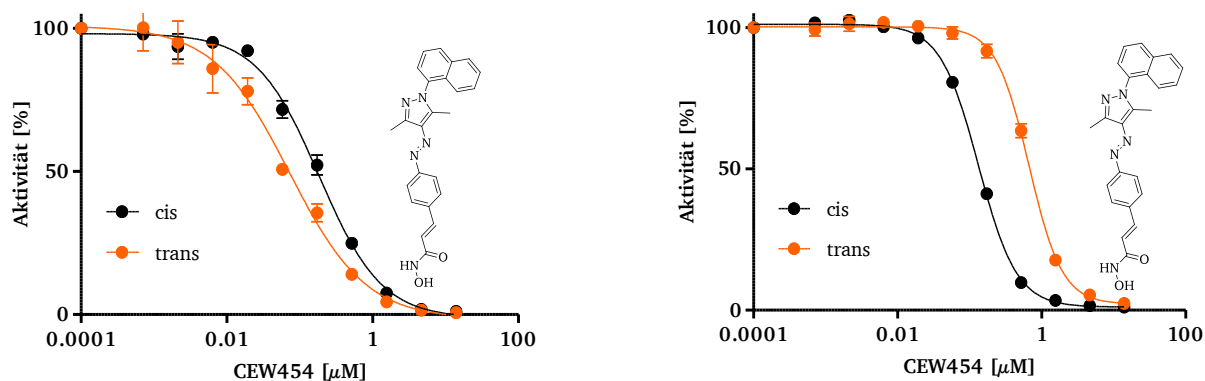


Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurven der Arylazopyrazol-Substanzen auf bakterielle HDACs. (A) zeigt die IC₅₀-Bestimmung von CEW454 auf PA3774. Der *trans*-Zustand inhibiert stärker als der *cis*-Zustand, wobei der Unterschied ca. den Faktor 3 betrug. (B) zeigt die IC₅₀-Bestimmung von CEW454 auf PA1409. Der *cis*-Zustand inhibiert ca. 6-fach stärker als der *trans*-Zustand.

4.4.2. IC₅₀-Bestimmungen der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDACs

Tabelle 12 zeigt die ermittelten IC₅₀-Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf die menschlichen HDAC-Enzyme der Klasse I.

Tabelle 12: Ermittelte IC₅₀ Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDAC-Enzyme der Klasse I in μM .

Inhibitor	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC8
CEW395 <i>cis</i>	0,53 \pm 0,02	1,5 \pm 0,1	0,81 \pm 0,05	1,2 \pm 0,1
CEW395 <i>trans</i>	0,60 \pm 0,03	2,5 \pm 0,3	0,63 \pm 0,06	1,8 \pm 0,1
Differenz	1-fach	< 2-fach	< 2-fach	< 2-fach
CEW416 <i>cis</i>	0,58 \pm 0,06	1,7 \pm 0,1	0,50 \pm 0,05	1,9 \pm 0,1
CEW416 <i>trans</i>	2,0 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	0,38 \pm 0,04	5,7 \pm 0,4
Differenz	< 4-fach	2-fach	< 2-fach	3-fach
CEW454 <i>cis</i>	0,54 \pm 0,05	1,4 \pm 0,1	0,37 \pm 0,03	3,2 \pm 0,1
CEW454 <i>trans</i>	2,9 \pm 0,4	5,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1	12 \pm 1 *
Differenz	< 6-fach	4-fach	3-fach	4-fach

*genauer Wert fragwürdig, da aufgrund geringer Löslichkeit des Inhibitors die maximale eingesetzte Konzentration 14,4 μM betrug und die Dosis-Wirkungskurve nicht das untere Plateau erreichte.

Im Vergleich zu den bakteriellen Homologen sind die Inhibitoren auf die menschlichen HDACs zwar weniger potent, zeigen aber dennoch ausreichend niedrige IC₅₀-Werte zwischen 0,5 und 15 μM . Dabei weist das *cis*-Isomer jeweils eine stärkere Inhibition auf. Erwartungsgemäß werden auch hier mit zunehmend voluminöserem Rest die Unterschiede zwischen den verschiedenen Konfigurationen ausgeprägter. Dies ist besonders eindrucksvoll bei HDAC1 und HDAC2 zu beobachten. Während die *cis*-Isomere nahezu identische IC₅₀-Werte aufweisen, werden mit zunehmender Größe des Restes die *trans*-Isomere stetig weniger potent. Mit einem Faktor von < 6 ist die größte Differenz bei HDAC1 mit in Verbindung CEW454 erreicht. HDAC3 wird zwar am stärksten inhibiert, zeige allerdings auch die geringsten Unterschiede zwischen den beiden Konfigurationen.

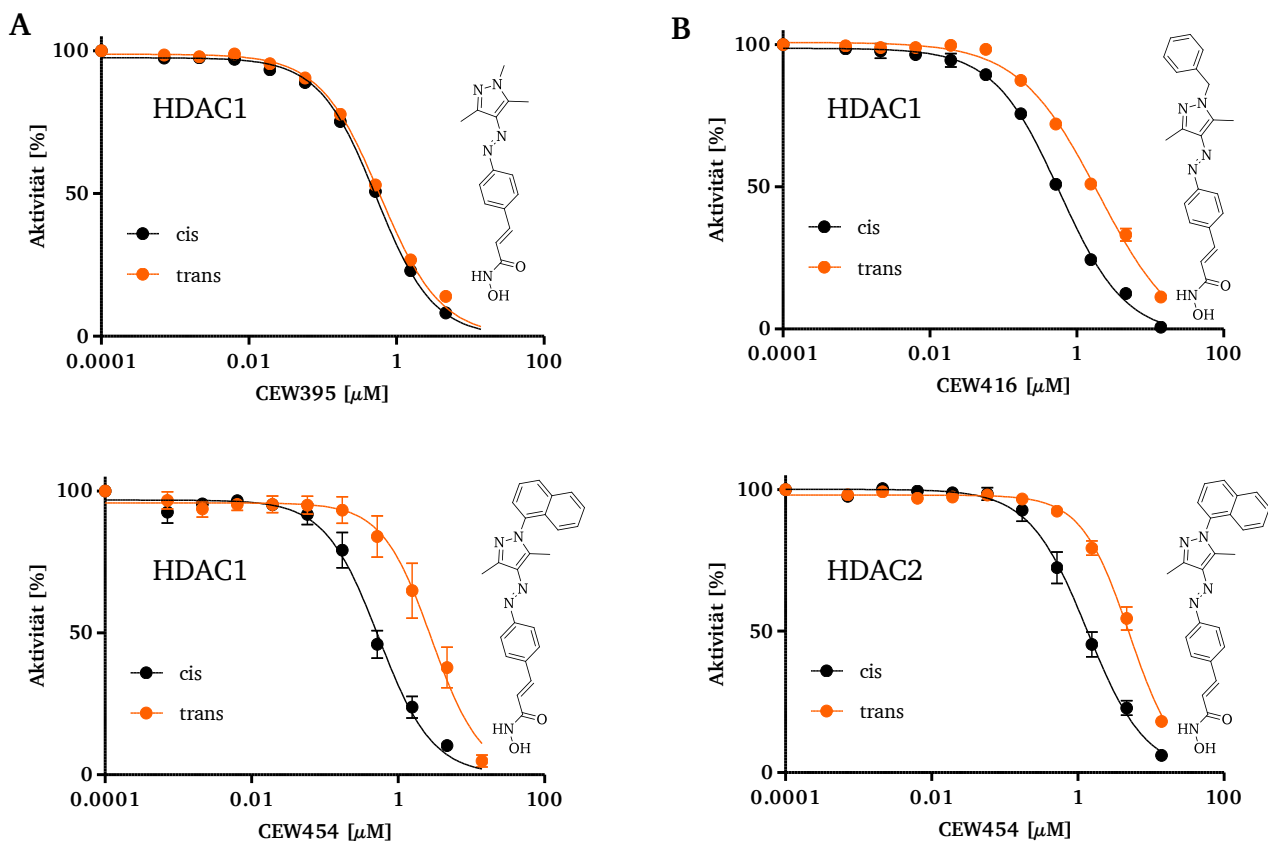


Abbildung 32: Dosis-Wirkungskurven der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDACs. (A, B, C) zeigen die IC_{50} -Bestimmungen drei verschiedener Arylazopyrazol-Derivate auf die menschliche HDAC1. Mit größer werdendem Rest am Pyrazolring werden die Unterschiede zwischen den Konfigurationen stetig ausgeprägter, wobei der Inhibitor in seiner *cis*-Konfiguration jeweils stärker inhibiert. (D) Zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW454 auf das Enzym HDAC2.

4.4.3. IC₅₀-Bestimmungen der Azobenzol-Derivate auf bakterielle HDACs

Die Tabelle 13 zeigt die ermittelten IC₅₀-Werte der Azobenzol-Derivate auf die bakteriellen HDACs.

Tabelle 13: Ermittelte IC₅₀-Werte der Azobenzol-Derivate auf bakterielle HDAC-Enzyme in μM .

Inhibitor	HDAH	PA3774	PA0321	PA1409
Stilben-Referenz <i>trans</i>	0,08 \pm 0,01	0,017 \pm 0,002*	0,94 \pm 0,03	2,5 \pm 0,2
Stilben-Referenz <i>cis</i>	0,11 \pm 0,02	0,011 \pm 0,001*	0,73 \pm 0,04	0,18 \pm 0,01
CEW65 <i>trans</i>	0,04 \pm 0,01*	0,006 \pm 0,001*	0,78 \pm 0,03	2,02 \pm 0,26
CEW65 <i>cis</i>	0,06 \pm 0,01	0,007 \pm 0,001*	0,40 \pm 0,02	0,21 \pm 0,1
Differenz	< 2-fach	< 2-fach	2-fach	10-fach
Stilben-Referenz <i>trans</i>	0,54 \pm 0,05	0,74 \pm 0,03	3,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,1
Stilben-Referenz <i>cis</i>	0,57 \pm 0,10	0,10 \pm 0,01	4,1 \pm 0,1	5,0 \pm 0,2
CEW69 <i>trans</i>	0,37 \pm 0,04	0,06 \pm 0,01	2,2 \pm 0,1	>25
CEW69 <i>cis</i>	0,38 \pm 0,04	0,10 \pm 0,01	1,8 \pm 0,06	3,5 \pm 0,2
Differenz	< 2-fach	2-fach	< 2-fach	>7-fach
Stilben-Referenz <i>trans</i>	0,09 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	1,4 \pm 0,1	0,78 \pm 0,04
Stilben-Referenz <i>cis</i>	0,13 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01	0,7 \pm 0,1	0,21 \pm 0,02
CEW76 <i>trans</i>	0,06 \pm 0,01	0,05 \pm 0,01	2,3 \pm 0,1	5,1 \pm 0,2
CEW76 <i>cis</i>	0,08 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	1,4 \pm 0,1	0,65 \pm 0,04
Differenz	< 2-fach	2-fach	2-fach	8-fach

^a genauer Wert fragwürdig, da der ermittelte Wert nahe der Hälfte der eingesetzten Proteinkonzentration liegt ^b genauer Wert fragwürdig, da aufgrund geringer Löslichkeit des Inhibitors die maximale eingesetzte Konzentration 14 μM betrug und die Dosis-Wirkungskurve nicht das untere Plateau erreichte.

Die Tendenzen, die bei den Arylazopyrazol-Derivaten beobachtet werden, finden sich bei den Azobenzol-Derivaten wieder. Bei den Enzymen FB188-HDAH und PA3774 sind die Inhibitoren in ihrer *trans*-Konfiguration potenter, wobei die Differenzen vergleichsweise gering ausfallen. Teilweise liegen die ermittelten IC₅₀-Werte leicht unter der eingesetzten Proteinkonzentration, was theoretisch nicht möglich ist. Diese Abweichungen sind aber gering und damit zu erklären, dass diese Enzyme bei Lagerung an Aktivität einbüßen und die tatsächliche aktive Enzymkonzentration deshalb geringer war. Daneben sind Bestimmungen der Proteinkonzentration methodisch bedingt immer fehlerbehaftet. Bei PA0321 und PA1409 ist der Inhibitor in seiner *cis*-Konfiguration der aktivere. Bei PA1409 sind die Differenzen zwischen den beiden Konfigurationen am ausgeprägtesten. Der signifikanteste Unterschied (10-fach) findet sich bei CEW65 (Tabelle 13 und Abbildung 33A).

Die IC_{50} -Werte der Azobenzol-Derivate und ihren zugehörigen Stilben-Referenz-Substanzen stimmen weitestgehend miteinander überein. Teilweise ist es eine leichte Verschiebung zwischen den Dosis-Wirkungskurven zu beobachten, wobei der relative Unterschied zwischen den Zuständen gewahrt bleibt (Abbildung 33B). Da dieser Effekt reproduzierbar war und an einem Tag mehrere Enzyme mit denselben Lösungen getestet wurden, der Effekt aber lediglich bei bestimmten Enzymen auftrat, können Fehler wie beispielsweise falsche Einwaagen ausgeschlossen werden.

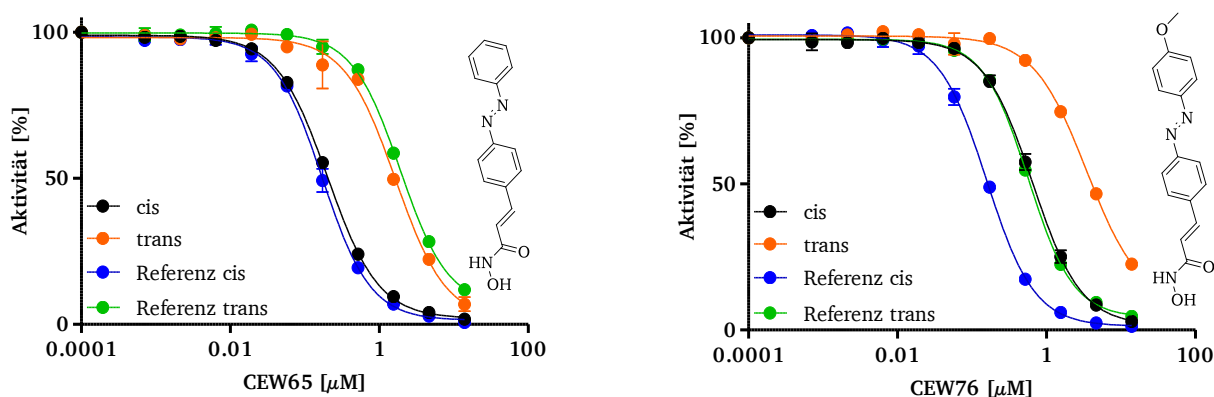


Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurven der Azobenzol-Derivate sowie ihren zugehörigen Stilben-Referenzen auf PA1409. (A) zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW65 auf das Enzym PA1409. Die Dosis-Wirkungskurven der Referenz-Substanzen stimmen nahezu mit denen des Azobenzol-Derivats in beiden Konfigurationen überein. **(B)** zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW76 auf das Enzym PA1409. Hier sind die Dosis-Wirkungskurven der Referenz-Substanzen zu niedrigeren IC_{50} -Werten hin verschoben, wobei das Verhältnis zwischen den beiden Zuständen annähernd gewahrt bleibt.

4.4.4. IC₅₀-Bestimmungen der Azobenzol-Derivate auf menschliche HDACs

Tabelle 14 zeigt die ermittelten IC₅₀-Werte der Azobenzol-Derivate auf die menschlichen HDAC-Enzyme der Klasse I sowie HDAC6 (Klasse IIb).

Tabelle 14: Ermittelte IC₅₀ Werte der Azobenzol-Derivate auf menschliche HDACs in μM .

Inhibitor	HDAC1	HDAC2	HDAC3	HDAC6	HDAC8
Stilben-Referenz <i>cis</i>	0,66 \pm 0,05	1,3 \pm 0,1	0,35 \pm 0,04	0,31 \pm 0,10	5,7 \pm 0,2
Stilben-Referenz <i>trans</i>	2,1 \pm 0,1	3,5 \pm 0,1	0,78 \pm 0,04	0,82 \pm 0,12	8,8 \pm 0,4
CEW76 <i>cis</i>	0,97 \pm 0,06	2,3 \pm 0,1	0,55 \pm 0,06	0,80 \pm 0,06	16 \pm 1 ^a
CEW76 <i>trans</i>	3,4 \pm 0,1	7,4 \pm 0,3	1,6 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	16 \pm 1 ^a
Differenz	4-fach	3-fach	3-fach	3-fach	
Stilben-Referenz <i>cis</i>	1,7 \pm 0,1	3,2 \pm 0,1	0,65 \pm 0,10	0,54 \pm 0,16	^b
Stilben-Referenz <i>trans</i>	10 \pm 1	15 \pm 1	4,5 \pm 0,1	1,9 \pm 0,1	^b
CEW69 <i>cis</i>	2,2 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	0,78 \pm 0,10	^b
CEW69 <i>trans</i>	10 \pm 1	16 \pm 1	1,6 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	^b
Differenz	< 5-fach	4-fach	< 2-fach	2-fach	
Stilben-Referenz <i>cis</i>	0,80 \pm 0,03	1,9 \pm 0,1	0,59 \pm 0,06	0,22 \pm 0,02	^b
Stilben-Referenz <i>trans</i>	8,5 \pm 0,7	17 \pm 1	2,4 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	^b
CEW65 <i>cis</i>	0,99 \pm 0,42	1,3 \pm 0,1	0,85 \pm 0,04	0,19 \pm 0,01	9,0 \pm 0,4
CEW65 <i>trans</i>	2,9 \pm 0,2	4,1 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	0,55 \pm 0,05	12 \pm 1 ^a
Differenz	3-fach	3-fach	> 2-fach	3-fach	< 2-fach

^a genauer Wert fragwürdig, da aufgrund geringer Löslichkeit des Inhibitors die maximale eingesetzte Konzentration 14 μM betrug und die Dosis-Wirkungskurve nicht das untere Plateau erreichte. ^b Messung konnte aufgrund von inaktivem Protein nicht durchgeführt oder reproduziert werden.

Die Azobenzol-Derivate zeigen ein ähnliches Inhibitionsverhalten wie die Arylazopyrazol-Derivate. Die ermittelten IC₅₀-Werte liegen etwa im gleichen Bereich. Auch hier zeigen die Inhibitoren in ihrer *cis*-Konfiguration eine stärkere Inhibition. Bis auf wenige Ausnahmen zeigen die Stilben-Referenzen eine hohe Übereinstimmung mit ihren korrespondierenden Azobenzol-Derivaten. Die signifikantesten Unterschiede, zwischen den beiden Konfigurationen, sind bei HDAC1 und HDAC2 zu sehen. Zusätzlich zur Klasse I ist mit HDAC6 ein Klasse IIb Enzym geteigt. Analog zur Klasse I inhibieren die *cis*-Isomere stärker. Die Schaltung dieser Derivate zeigt maximal einen ca. 5-fachen Unterschied (HDAC1).

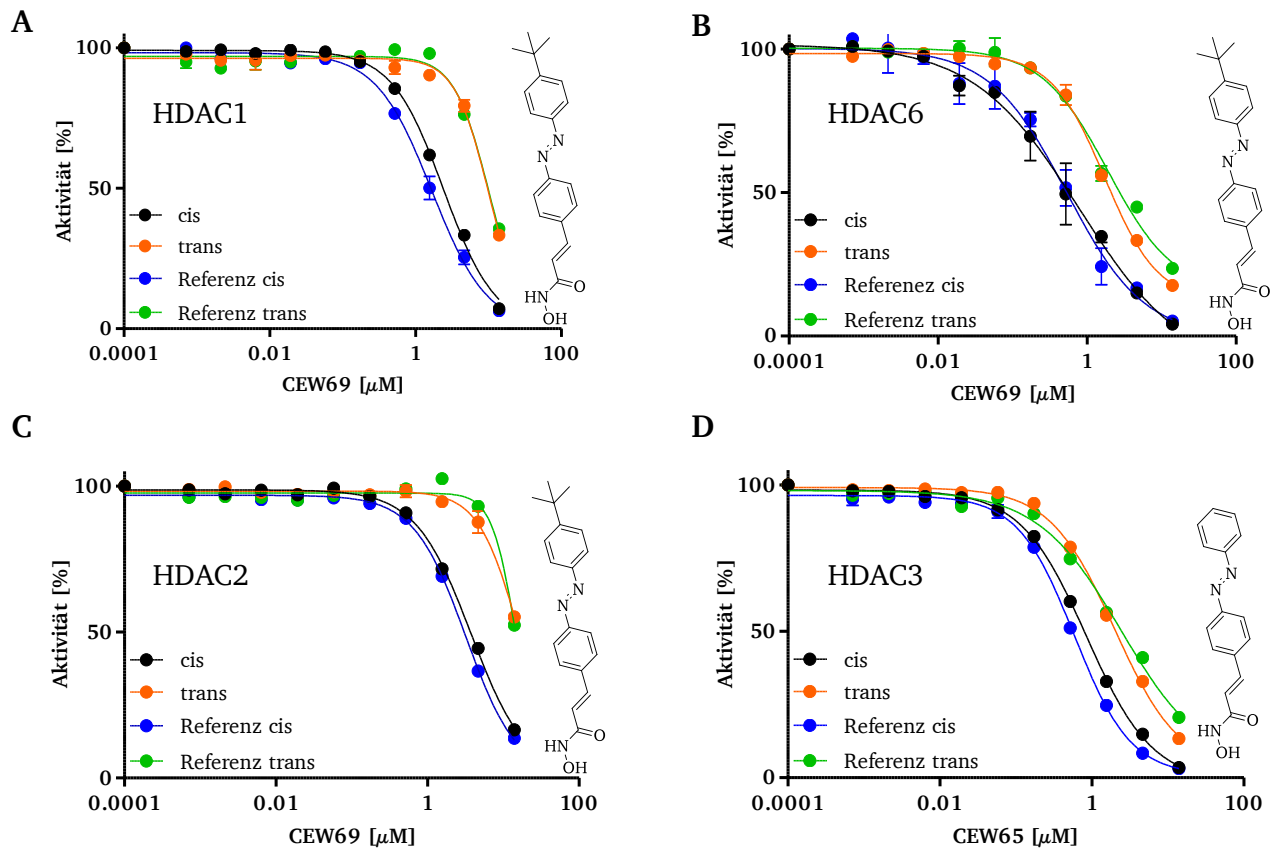


Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven der Azobenzol-Derivate mit zugehörigen Stilben-Referenzen auf menschliche HDACs. (A) zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW69 auf HDAC1. (B) zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW69 auf HDAC6. (C) zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW69 auf HDAC2. (D) zeigt die IC_{50} -Bestimmung von CEW65 auf HDAC3. Die Dosis-Wirkungskurven der Referenz-Substanzen zeigten eine hohe Übereinstimmung mit den jeweiligen Azobenzol-Derivaten.

4.5. Entwicklung eines Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays

In Kooperation mit Robert Wawrzinek und Pablo Wessig von der Universität Potsdam wurde ein Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assay entwickelt. Der Kollaborationspartner forscht an Fluoreszenzfarbstoffen und entwickelte dabei eine Reihe von [1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol (DBD) Derivate, welche vielversprechende Eigenschaften aufweisen¹⁰³. Für den im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Assay wurde der Farbstoff mit Hydroxamsäuren kombiniert, um eine Affinität gegenüber den bakteriellen HDAC-Enzymen zu erzeugen. Bei Vorversuchen von C. Meyners zeigte ein Derivat besonders günstige Eigenschaften in Bezug auf Affinität und Fluoreszenzlebensdauer. Diese Sonde ist in Abbildung 35 dargestellt.

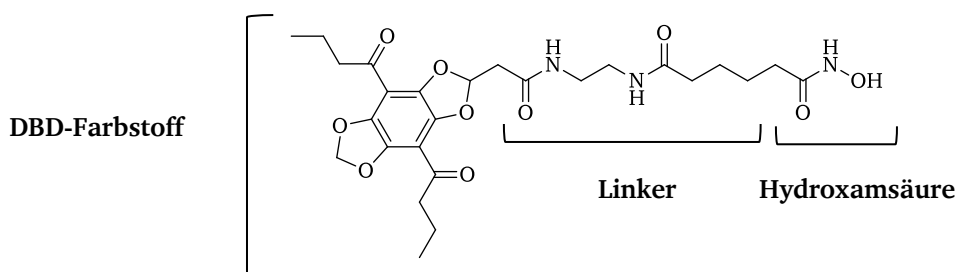


Abbildung 35: Design der DBD-Sonde.

4.5.1. Bestimmung der FLT Parameter und optimalen Proteinmenge

Im Vorfeld musste zuerst die optimale Proteinmenge ermittelt werden. Für einen effizienten Assay sollten alle Komponenten in möglichst geringer Konzentration eingesetzt werden. Zur Bestimmung der wurden 50 nM der fluoreszierenden DBD-Sonde mit steigenden Konzentrationen an Protein titriert. Die eingesetzte Konzentration der Sonde von 50 nM wurde in Vortests ermittelt und stellte einen Kompromiss aus einem gutem Signal-Rauschverhältnis und einer möglichst geringen Menge des eingesetzten Liganden dar. Ziel war es die Konzentration zu ermitteln, bei der ca. 60-80 % Bindungsgrad (BD) erreicht werden.

Abbildung 36 zeigt die Dosis Wirkungskurven der drei Enzyme aus *P. aeruginosa* und Tabelle 15 die daraus abgeleitete Werte für Δ FLT und K_d .

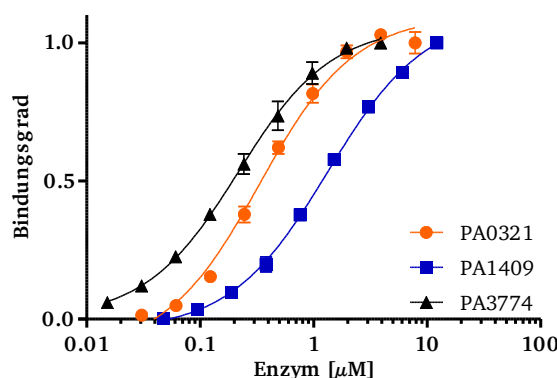


Abbildung 36: Bestimmung der FLT-Parameter. Die Abbildung zeigt die Auftragung des Bindungsgrades gegen die jeweilige Enzymkonzentration.

Tabelle 15: Bestimmte FLT-Parameter.

Parameter	PA0321	PA1409	PA3774
ΔFLT [ns]	$4,9 \pm 0,1$	$7,2 \pm 0,1$	$5,3 \pm 0,1$
K_d [μM]	$0,31 \pm 0,03$	$1,3 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,01$
60-80 % BD [μM]	0,75	1,5	0,47

Die ermittelten Werte bestätigten die Erwartungen aus den Vorversuchen. Die Fluoreszenzlebensdauer änderte sich im vollständigen gebundenen Zustand um bis zu 7,2 ns (PA1409). Die ermittelten K_d -Werte waren im gewünschten Bereich, bei der die Sonde eine ausreichende, aber nicht zu hohe Affinität zum jeweiligen Enzym aufweist.

4.5.2. Bestimmung der inhibitorische Konstante durch FLT-Assay

Aus den unter 4.5.1 erhaltenen Dosis-Wirkungskurven ließen sich die Proteinkonzentrationen ablesen, bei denen ca. 60-80 % Bindungsgrad der Sonde erreicht waren (Tab. 15). Damit konnten quantitativ die inhibitorischen Konstanten K_i für potenzielle Inhibitoren bestimmt werden.

Dazu wurden zur jeweiligen Proteinlösung 50 nM des Fluorophors gegeben und dieses Gemisch mit steigenden Konzentrationen an Inhibitoren titriert. Aus den sukzessiven Änderungen der FLT konnten anschließend die Bindungskonstanten, mithilfe der in Abschnitt 3.4.7 vorgestellten Formeln, berechnet werden. Um die Aussagekraft der ermittelten Resultate bewerten zu können, wurden die Ergebnisse mit K_i -Werten verglichen, die aus dem AMC-Assay abgeleitet wurden. Um die dort erhaltenen IC_{50} -Werte in Werte für K_i umzurechnen, wurde die Cheng-Prusoff-Gleichung verwendet. Die Ergebnisse aus beiden unabhängigeren Bestimmungen sind in Tabelle 16 gegenübergestellt. Die Strukturformeln der eingesetzten Inhibitoren finden sich im Anhang unter 8.3.

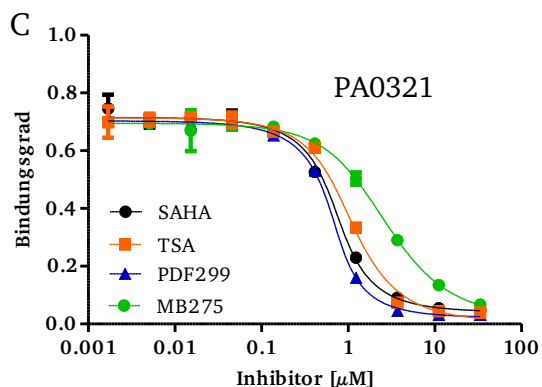
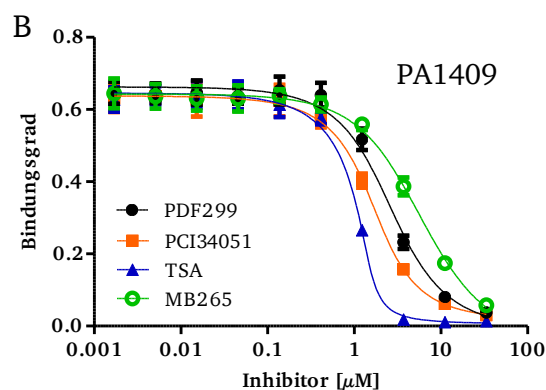
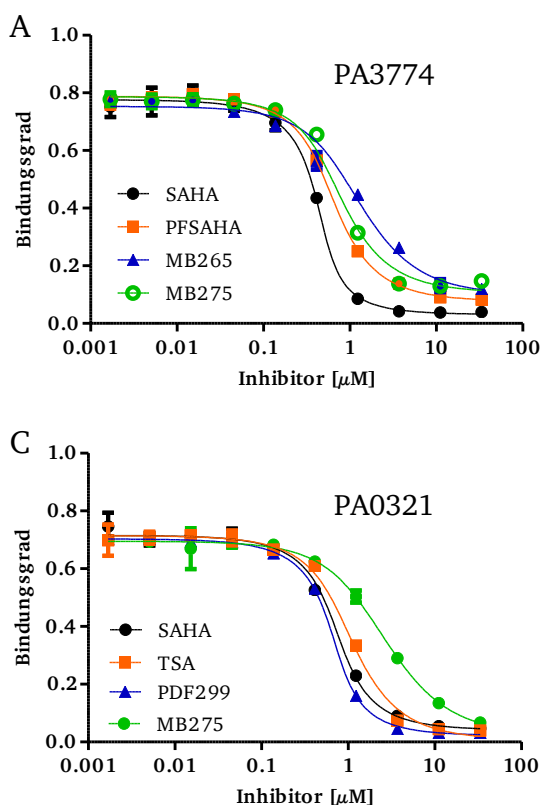


Abbildung 37: Dosis Wirkungskurven des FLT-Kompetitions-Assays mit ausgewählten Inhibitoren. (A) PA3774 (B) PA1409 (C) PA0321

Tabelle 16: Vergleich der K_i -Werte aus FLT-Assay und AMC-Assay.

Inhibitor	PA1409		PA3774		PA0321	
	K_i [μ M] ^a	K_i [μ M] ^b	K_i [μ M] ^a	K_i [μ M] ^b	K_i [μ M] ^a	K_i [μ M] ^b
SAHA	< 0,03	$0,19 \pm 0,02$	< 0,03	$0,013 \pm 0,001$	$0,059 \pm 0,008$	$0,28 \pm 0,02$
PCI 34051	$0,32 \pm 0,07$	$0,74 \pm 0,06$	$0,08 \pm 0,02$	$0,92 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,02$	$0,46 \pm 0,02$
TSA	$0,04 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,02$	$0,14 \pm 0,02$	$0,36 \pm 0,02$
PFSAHA	23 ± 13	$10,0 \pm 1,7$	$0,08 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,002$	$0,16 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,04$
SATFMK	< 0,03	$0,12 \pm 0,01$	< 0,03	$0,0033 \pm 0,0002$	$0,019 \pm 0,005$	$0,0034 \pm 0,0003$
MB275	$2,3 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,4$	$0,11 \pm 0,02$	-	$0,62 \pm 0,06$	$2,2 \pm 0,1$
PDF299	$0,82 \pm 0,01$	$0,46 \pm 0,05$	< 0,03	$0,025 \pm 0,001$	$0,038 \pm 0,006$	$0,10 \pm 0,01$
MB265	$0,25 \pm 0,06$	$5,8 \pm 0,5$	$0,26 \pm 0,04$	$8,9 \pm 0,8$	$0,17 \pm 0,02$	$0,56 \pm 0,03$

^a Berechnet aus FLT-Assay

^b Berechnet aus den IC_{50} -Werten, die aus AMC-Assay stammen unter Verwendung der Cheng-Prusoff-Gleichung

Zusammenfassend liegen die K_i -Werte, der beiden unabhängigen Assays, meist im gleichen Größenbereich und zeigen eine gute Übereinstimmung. Teilweise gibt es allerdings größere Abweichungen. Mögliche Gründe hierfür werden in 5.5 diskutiert. Die interne Rangfolge ist ebenfalls bis auf wenige Ausnahmen identisch. Starke Inhibitoren zeigen in ihren Dosis-Wirkungskurven eine stärkere Steigung und sind eindeutig von schwächeren unterscheidbar, die eine abgeflachte Steigung aufwiesen (Abbildung 37).

4.6. Kristallisationsversuche

4.6.1. Kristallisation des Enzyms PA3774

Erste Kristallisationsversuche, des strukturell unbekannten Enzyms PA3774 wurden mit kommerziell erhältlichen Screens bei verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt. Nach etlichen Versuchen erwies sich der Zusatz des Reduktionsmittels TCEP am Ende der Reinigung als entscheidend und es konnten erste Kristalle in den folgenden beiden Bedingungen erhalten werden (Tabelle 17).

Tabelle 17: Erfolgreiche Bedingungen aus den Initial-Screens.

Screen / Hersteller	Kavität Nummer	Bedingung
Nextal MB classic Suite 2	13	0,5 M K_2HPO_4
		0,5 M Na_2HPO_4
		0,1 M Ammoniumsulfat
		pH 7,5
Nextal classic Suite 2	22	0,8 M Bernsteinsäure pH 7

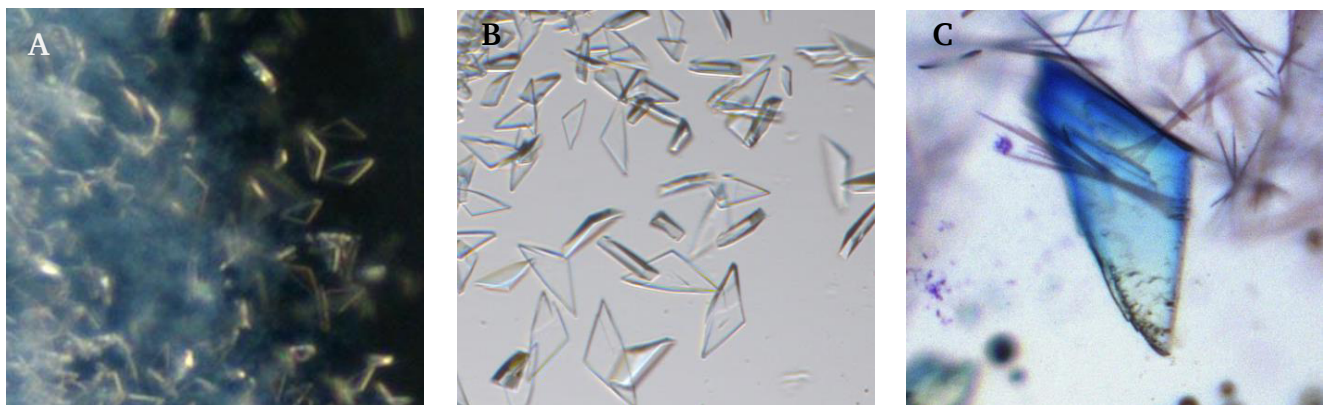


Abbildung 38: Initial erhaltene Kristalle. (A) Kristalle der „Bernsteinsäure-Bedingung“. (B) Kristalle der „Phosphat-Bedingung“. (C) Mit Bromphenolblau angefärbter Kristall.

In der „Bernsteinsäure-Bedingung“ (Abbildung 38A) als auch in der „Phosphat-Bedingung“ (Abbildung 38B) wurden Kristalle in Form von flachen dreieckigen Prismen erhalten. Die Kristalle hatten unterschiedliche Größen im Bereich von 0,01-0,3 mm. Bei Zugabe des Farbstoffs Bromphenolblau nahmen die Kristalle diesen auf, was als sicherer Hinweis gilt, dass es sich um Proteinkristalle und nicht um Salzkristalle handelt (Abbildung 38C).

Erste Messungen am Synchrotron bestätigten, dass es sich um Proteinkristalle handelte. Die Kristalle beider Bedingungen streuten bis zu einer Auflösung von ca. 6 Å. Jedoch waren diese verwachsen und wiesen mehrere Schichten auf, die teilweise nur mit einem hochauflösenden Mikroskop zu erkennen waren (Abbildung 39A). Dies hatte zur Folge, dass Doppelspots im Diffraktionsmuster auftraten, was die Integrierung der Daten erschwerte bzw. zu nicht eindeutigen Ergebnissen bezüglich der Raumgruppe führte. Darüber hinaus zeigten die Kristalle bereits nach kurzer Bestrahlung hohe Schäden, was unvollständige Datensätze nach sich zog.

Daraufhin wurde durch Feinscreens versucht die Qualität der Kristalle zu verbessern. In der „Bernsteinsäure-Bedingung“ konnten Kristalle im Bereich von 0,65–0,9 M Bernsteinsäure und einem pH-Bereich zwischen 6,5–8 erhalten werden. Messungen am Synchrotron ließen jedoch keine Verbesserung der Kristallqualität erkennen und das Grundproblem der Kristallverwachsung blieb bestehen.

In der „Phosphat-Bedingung“ führte einer Verringerung der Ammoniumsulfatkonzentration auf 0,02–0,07 M sowie eine Verringerung der Phosphatkonzentration auf 0,47–0,42 M dazu, dass zusätzlich eine weitere Kristallform auftrat (Abbildung 39B und C). Diese Kristalle hatten das Problem der Verwachsung bzw. multipler Gitter nicht. Erste Messungen am Synchrotron ergaben zudem eine höhere Symmetrie (P4 tetragonal). Da bei der Raumgruppe P4 der Kristall lediglich um 90° während der Messung rotiert werden muss, um einen vollständigen Datensatz zu erhalten, wirkte sich dies zudem positiv auf die Vollständigkeit der Datensätze aus, zumal das Problem der Strahlenschäden erhalten blieb. Eine Proteinkonzentration von 6 mg/ml und eine Temperatur von 18°C erwiesen sich als optimal. Der verwendete Feinscreen findet sich im Anhang unter 8.1. Die Mutanten PA3774_{H143A} sowie PA3774_{Y313F} kristallisierten ebenfalls in dieser Bedingung (Abbildung 39C). Alle Kristalle wuchsen innerhalb von 2-5 Tagen.

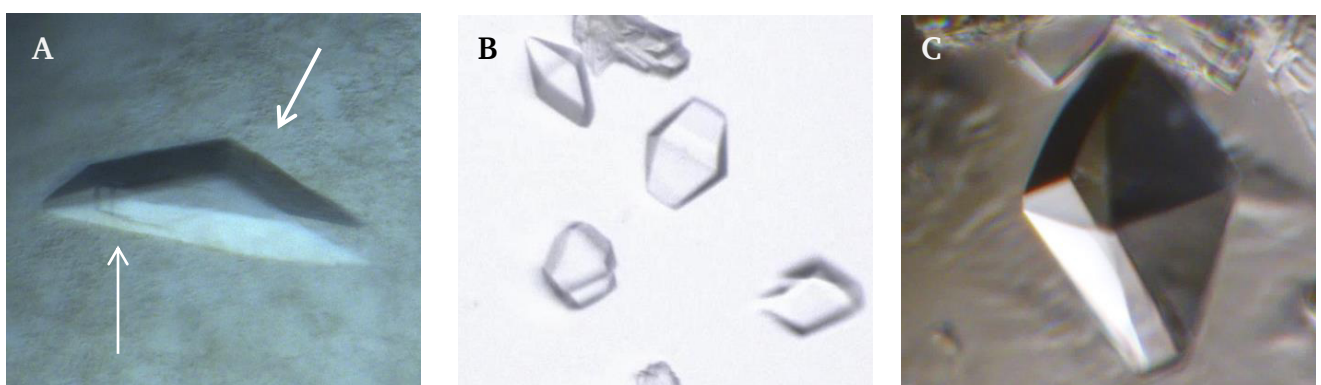


Abbildung 39: Verschiedene Kristallformen von PA3774 im Vergleich. (A) Das Bild zeigt exemplarisch das Problem der dreieckig prismatischen Kristallform. Selbst auf den ersten Blick fehlerfrei gewachsene Einkristalle, wiesen bei genauerer Betrachtung Verwachsungen auf (Pfeile in A). **(B)** Tetragonale Kristalle **(C)** Kristall der PA3774_{H143A} Mutante gewachsen in der „Phosphat-Bedingung“.

4.6.2. Kristallisation des Enzyms FB188-HDAH

Die Struktur des Enzyms FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* war bereits bekannt. Zur Untersuchung von noch nicht bekannten Enzym-Liganden-Komplexe und Vergleichszwecken sollte die Kristallisation im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden. Als Ausgangspunkt dienten die publizierten Kristallisationsbedingungen^{91, 104} sowie nicht publizierte Bedingungen aus der Dissertation von Christian Hildmann.

Tabelle 18 zeigt die Kristallisationsbedingungen die als Basis für die jeweiligen Feinscreens verwendet wurden.

Tabelle 18: Ausgangsbedingungen für die Kristallisation des Enzyms FB188-HDAH.

„Phosphat-Bedingung“	„PEG 400-Bedingung“	„PEG 4000-Bedingung“
1,3 M Natrium/Kaliumphosphat	0,1 M Imidazol-Malat-Puffer	0,1 M Imidazol-Malat-Puffer
50 mM Natriumacetat	5 % (v/v) PEG 400	22,5 % (v/v) PEG 4000
5 % (v/v) 1,4- Butandiol	pH 5,25	pH 7,0
pH 5,5		

Kristalle konnten in allen Feinscreens, bei Proteinkonzentration von 5-15 mg/ml, erhalten werden, wobei sich 10 mg/ml als optimal herausstellte. Die genaue Zusammensetzung der erfolgreichen Screen findet sich im Anhang unter 8.1

In der „Phosphat-Bedingung“ wuchsen zwar Kristalle guter Qualität, allerdings meist nur 1-2 pro Platte und erst nach mehreren Wochen (Abbildung 40A).

Der Feinscreen um die „PEG 400-Bedingung“ brachte die vielversprechendsten Kristalle hervor. Hier konnten im Bereich von 1-13 % (v/v) PEG 400, bei konstantem pH Wert, eine hohe Menge an Einkristallen, mit ausreichender Größe, erhalten werden. Die Mehrheit der Kristalle erschien nach ca. 2-9 Tagen (Abbildung 40B).

Die Kristalle der „PEG 4000-Bedingung“ zeigten viele Verwachsungen und waren für eine Messung am Synchrotron unbrauchbar (Abbildung 40C).

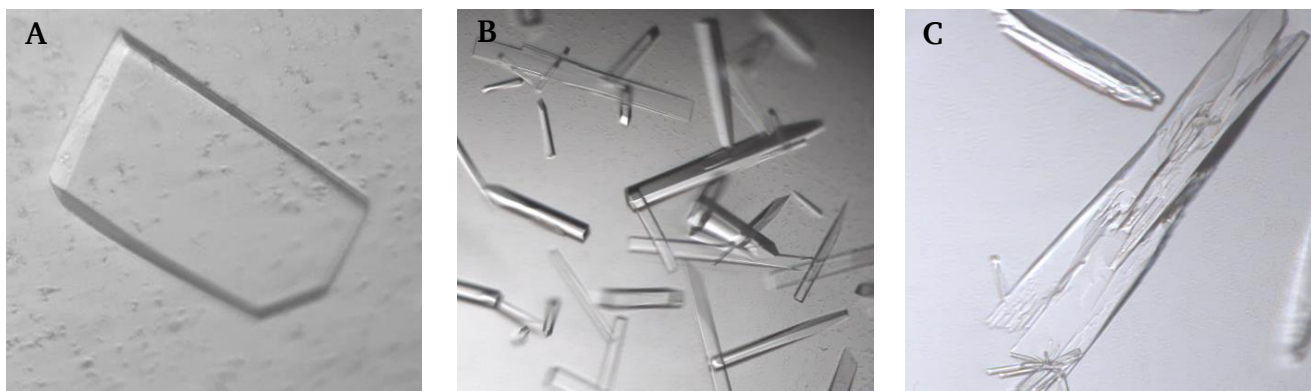


Abbildung 40: FB188-HDAH-Kristalle aus verschiedenen Bedingungen im Vergleich. (A) Kristalle aus der „Phosphat-Bedingung“ hatten die Form von flachen Plättchen. Die spätere Kristallstrukturanalyse ergab die orthorhombische Raumgruppe I222. (B) Die Kristalle der „PEG 400-Bedingung“ hatten die Form von Balken. Die Kristallstrukturanalyse ergab die tetragonale Raumgruppe $P4_22_12$ (C) Die Kristalle aus der „PEG 4000-Bedingung“ waren verwachsen und für eine Messung nicht geeignet.

Die Kristallisation der FB188-HDAH sollte der Untersuchung von Enzym-Liganden-Komplexen dienen. Da Co-Kristallisation nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurden die Kristalle mit den zu untersuchenden Inhibitoren inkubiert (*engl. soaking*). Die Kristalle nahmen davon keine Schäden. Abbildung 41 zeigt eine Auswahl der gelborangefarbenen Azopyrazol-Inhibitoren CEW416 (Abbildung 41A), CEW395 (Abbildung 41B) sowie des Azobenzol-Inhibitors CEW65. Die Kristalle „saugten“ diese Inhibitoren nach Zugabe auf und verfärbten sich dementsprechend.

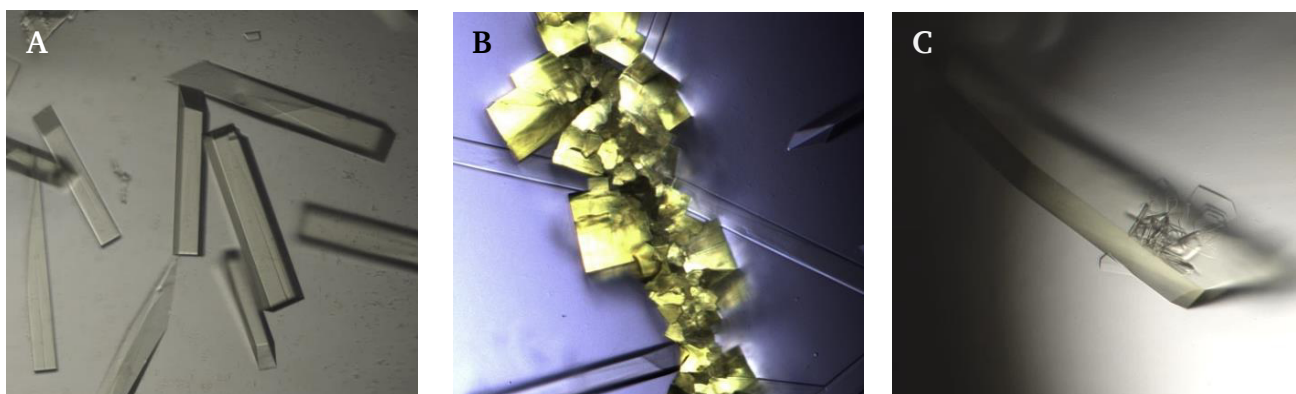


Abbildung 41: Mit Inhibitoren inkubierte FB188-HDAH-Kristalle. (A) mit CEW416 (B) mit CEW395. (C) mit CEW65. Die Kristalle nahmen die Farben der Inhibitoren an. In (B) ist die Blickrichtung teilweise entlang des „Balkenkristalls“ was die Färbung besonders deutlich erkennen lässt.

4.7. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung

4.7.1. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung des Enzyms PA3774

Für das Enzym PA3774 konnten insgesamt sieben Strukturen bestimmt werden. Alle gingen auf die tetragonale Kristallform zurück. Um das Phasenproblem zu lösen, konnte die Methode des molekularen Ersatzes angewendet werden (siehe 3.5.3). Als ursprüngliches Suchmodell wurde eine simulierte Struktur von SWISSMODEL¹⁰⁵ verwendet. Das Modell erwies sich als zwar als ausreichend, allerdings mussten viele Bereiche des Enzyms komplett neu gebaut werden.

Alle Datensätze besitzen eine Vollständigkeit (*engl. completeness*) von nahezu 100 %. Die Auflösung schwankt zwischen 1,7 Å (PA3774-Acetat und PA3774-SATFMK) und 2,5 Å (PA3774_{Y313F}-PFSAHA), was in allen Fällen ausreichend hoch ist, um die Orientierung der Proteinseitenketten zu erkennen.

Die asymmetrische Einheit (ASU) besteht aus einem Dimer und die Elementarzelle ist aus acht dieser Dimere aufgebaut. Bis auf wenige Aminosäuren am N- und C-Terminus, sind beide Monomere pro ASU jeweils vollständig beschrieben und es gibt keine ungeordneten Regionen innerhalb des Proteins. Alle Strukturen sind nach angemessenen physikalischen Parametern verfeinert, validiert, auf der PDB Homepage hinterlegt und publiziert. Die genauen Statistiken der Datensammlung sowie der Verfeinerung (*engl. Refinement*) sowie die zugehörigen PDB-Identifikationscodes finden sich in den Tabellen 19 und 20.

Tabelle 19: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der aufgeklärten PA3774-Strukturen.

Datensatz	PA3774-nativ	PA3774-SATFMK	PA3774-Acetat	PA3774-CEW395
PDB-CODE	5G0Y	5G10	5G0X	5LI3
Datensammlung				
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
a, b, c (Å)	81.5, 81.5, 203.2	81.7, 81.7, 205.2	81.7, 81.7, 205.9	82.19, 82.19, 217.03
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90	90.0, 90.0, 90.0
I/sd(I) ^a	5.3 (2.2)	8.2 (2.1)	5.9 (2.4)	8.3 (2.2)
Wellenlänge (Å)	1.00001	0.97902	1.00002	1.00002
Auflösung (Å)	75.68 - 2.29	75.94 - 1.71	75.70 – 1.70	76.87 - 2.40
alle Reflexe	175199	578699	885648	333402
einzigartige Reflexe	31717	75585	77011	30117
Vollständigkeit (%) ^a	99.9 (100.0)	100.0 (100.0)	100.0 (99.9)	100.0 (100.0)
Multiplizität ^a	5.5 (5.5)	7.7 (8.0)	11.5 (12.2)	11.1 (11.5)
R _{pim}	0.117 (0.502)	0.062 (0.478)	0.088 (0.339)	0.070 (0.527)
Verfeinerung				
R _{cryst} ^b	0.182	0.1579	0.1343	0.2247
R _{free} ^c	0.221	0.1937	0.1840	0.2701
Anzahl Atome ^d	5953	6359	6307	5857
Aminosäuren ^d	749	746	746	
Liganden Moleküle ^d	2	2	2	2
Metallionen ^d	6	6	6	6
Wasser ^d	217	625	535	156
Lösungsmittelmoleküle ^d			2	
Rmsd vom ideal				
Bindungslängen (Å)	0.0110	0.0178	0.0126	0.0078
Bindungswinkel (°)	1.505	1.455	1.508	1.391
Ramachandran plot (%)				
favorisiert	94.63	95.42	95.28	94.04
erlaubt	4.16	3.64	3.77	5.01
Ausreißer	1.21	0.94	0.94	0.95

^a Werte in Klammern geben die höchstaflösenden Schale an. ^b $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, mit F_o = gemessene Strukturfaktor Amplituden und F_c = errechnete Strukturfaktor Amplituden des Models. Die Intensität wurde durch Replikate berechnet. ^c R_{free} ist R_{cryst} mit 5 % unbehandelter Daten. ^d pro asymmetrische Einheit.

Tabelle 20: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der aufgeklärten PA3774-Mutanten-Strukturen.

Datensatz	PA3774 _{H143A} -nativ	PA3774 _{Y313F} -nativ	PA3774 _{Y313F} -PFSAHA
PDB-CODE	5G13	5G12	5G11
Datensammlung			
Raumgruppe	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2	P4 ₁ 2 ₁ 2
a, b, c (Å)	81.4, 81.4, 204.1	81.6, 81.6, 205.2	81.8 81.8 204.9
α, β, γ (°)	90, 90, 90	90, 90, 90	90, 90, 90
I/sd(I) ^a	11.2 (4.8)	6.2 (2.7)	11.4 (6.9)
Wellenlänge (Å)	0.97903	1.00001	1.00002
Auflösung (Å)	75.80 - 1.99	75.79 - 2.02	75.96 - 2.48
alle Reflexe	750443	457059	288702
einzigartige Reflexe	48272	46280	25472
Vollständigkeit (%) ^a	99.5 (94.1)	99.4 (96.8)	100.0 (100.0)
Multiplizität ^a	15.5 (11.7)	9.9 (9.1)	11.3 (11.6)
R _{pim}	0.044 (0.108)	0.092 (0.467)	0.050 (0.097)
Verfeinerung			
R _{cryst} ^b	0.1631	0.1836	0.1678
R _{free} ^c	0.2183	0.2222	0.2240
Anzahl Atome ^d	5671	6122	6011
Aminosäuren ^d	746	743	744
Liganden Moleküle ^d	2	2	2
Metallionen ^d	6	6	6
Wasser ^d	454	380	276
Rmsd vom ideal			
Bindungslängen (Å)	0.0131	0.0099	0.0105
Bindungswinkel (°)	1.546	1.444	1.581
Ramachandran plot (%)			
favorisiert	95.42	96.16	95.00
erlaubt	3.64	2.71	3.92
Ausreißer	0.94	1.10	1.08

^a Werte in Klammern geben die höchstaflösenden Schale an. ^b $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, mit F_o = gemessene Strukturfaktor Amplituden und F_c = errechnete Strukturfaktor Amplituden des Models. Die Intensität wurde durch Replikate berechnet. ^c R_{free} ist R_{cryst} mit 5 % unbehandelter Daten. ^d pro asymmetrische Einheit.

4.7.2. Datensammlung, Modellbau und Strukturlösung des Enzyms FB188-HDAH

Da die Struktur des Enzyms FB188-HDAH bereits bekannt war, konnte das Phasenproblem mit der Methode des molekularen Ersatzes gelöst werden. Als Suchmodell diente ein Monomer der Struktur 1ZZ0. Die tetragonalen Kristalle aus der „PEG 400-Bedingung“ kristallisierten, in der für dieses Enzym nie zuvor beschriebenen Raumgruppe $P4_22_12$, mit zwei Monomeren innerhalb der asymmetrischen Einheit (ASU).

Der Kristall aus der Phosphatbedingung kristallisierte in der bereits beschriebenen Raumgruppe $I222$ mit vier Monomeren innerhalb der ASU.

Die Qualität aller Datensätze ist außerordentlich hoch. Vom N- bis zum C-Terminus sind alle Aminosäuren definiert. Die hohen Auflösungen zwischen 1,4 Å und 1,8 Å erlauben eine genaue Interpretation der Enzym-Liganden-Interaktionen. Die Strukturen wurden nach angemessenen physikalischen Parametern verfeinert, validiert, auf der PDB Homepage hinterlegt und publiziert. Die genauen Statistiken der Datensammlung sowie der Verfeinerung (*engl. Refinement*) und des zugehörigen PDB-Identifikationscodes finden sich in den Tabellen 22 und 23.

Tabelle 21: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der FB188-HDAH-Liganden-Komplexe.

Datensatz	HDAH-PFSAHA	HDAH-nativ	HDAH _{T101A} -SATFMK
PDB-CODE	5G1A	5G1B	5G17
Datensammlung			
Raumgruppe	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2
a, b, c (Å)	101.4, 101.4, 175.9	100.7, 100.7, 175.1	101.3, 101.3, 175.2
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.0
I/sd(I) ^a	11.8 (2.3)	8.4 (2.3)	11.5 (2.7)
Wellenlänge (Å)	1.00002	0.99988	1.03894
Auflösung (Å)	87.96 - 1.42	87.56 - 1.70	87.68 - 1.51
alle Reflexe	1138350	789531	1691308
einzigartige Reflexe	168945	99299	142442
Vollständigkeit (%) ^a	97.4 (95.4)	100.0 (100.0)	100.0 (100.0)
Multiplizität ^a	6.7 (7.1)	8.0 (8.2)	11.9 (12.2)
R _{pim}	0.035 (0.373)	0.052 (0.336)	0.038 (0.317)
Verfeinerung			
R _{cryst} ^b	0.1435	0.1517	0.1297
R _{free} ^c	0.1701	0.1915	0.1579
Anzahl Atome ^d	6728	6595	6505
Aminosäuren ^d	740	743	737
Liganden Moleküle ^d	2	2	2
Metallionen ^d	6	6	6
Wasser ^d	933	915	915
PEG-Moleküle ^d	10	8	
Rmsd vom ideal			
Bindungslängen (Å)	0.0082	0.0100	0.0132
Bindungswinkel (°)	1.520	1.508	1.509
Ramachandran plot (%)			
favorisiert	96.89	96.70	96.42
erlaubt	2.55	2.47	2.89
Ausreißer	0.57	0.82	0.69

^a Werte in Klammern geben die höchstaflösenden Schale an. ^b $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, mit F_o = gemessene Strukturfaktor Amplituden und F_c = errechnete Strukturfaktor Amplituden des Models. Die Intensität wurde durch Replikate berechnet. ^c R_{free} ist R_{cryst} mit 5 % unbehandelter Daten. ^d pro asymmetrische Einheit.

Tabelle 22: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der FB188-HDAH-Liganden-Komplexe.

Datensatz	HDAH-CEW395	HDAH-PD 404,182	HDAH-CEW65
PDB-CODE	5G1C		5G3W
Datensammlung			
Raumgruppe	P4 ₂ 2 ₁ 2	P4 ₂ 2 ₁ 2	I222
a, b, c (Å)	101.08, 101.08, 175.05	100.7, 100.7, 175.5	92.27, 130.14, 251.13
α, β, γ (°)	90.0, 90.0, 90.0	90.0, 90.0, 90.	90.0, 90.0, 90.0
I/sd(I) ^a	15.4 (5.3)	10.6 (2.3)	9.1 (2.9)
Wellenlänge (Å)	1.00004	0.99988	1.00002
Auflösung (Å)	87.56 - 1.81	87.77 – 1.47	125.60 - 1.60
alle Reflexe	1710611	1991454	1099504
einzigartige Reflexe	82927	152110	197317
Vollständigkeit (%) ^a	99.9 (99.3)	100 (99.9)	99.7 (99.8)
Multiplizität ^a	20.6 (21.0)	13.1 (13.4)	5.6 (5.5)
R _{pim}	0.033 (0.155)	0.043 (0.409)	0.050 (0.234)
Verfeinerung			
R _{cryst} ^b	0.1710	0.1441	0.1245
R _{free} ^c	0.2185	0.1726	0.1663
Anzahl Atome ^d	6742	6532	13153
Aminosäuren ^d	742	738	1478
Liganden Moleküle ^d	2	2	3
Metallionen ^d	6	6	12
Wasser ^d	989	849	1791
PEG-Moleküle ^d	9	9	17
Rmsd vom ideal			
Bindungslängen (Å)	0.0106	0.0118	0.0097
Bindungswinkel (°)	1.605	1.519	1.502
Ramachandran plot (%)			
favorisiert	96.08	96.56	96.46
erlaubt	3.36	2.48	2.84
Ausreißer	0.56	0.96	0.69

^a Werte in Klammern geben die höchstaufauflösende Schale an. ^b $R_{\text{cryst}} = \sum ||F_o| - |F_c|| / \sum |F_o|$, mit F_o = gemessene Strukturfaktor Amplituden und F_c = errechnete Strukturfaktor Amplituden des Modells. Die Intensität wurde durch Replikate berechnet. ^c R_{free} ist R_{cryst} mit 5 % unbehandelter Daten. ^d pro asymmetrische Einheit.

4.8. Strukturbeschreibung des Enzyms PA3774

4.8.1. Beschreibung der asymmetrischen Einheit

Die asymmetrische Einheit (ASU) besteht aus einem Homodimer, bei dem beide Monomere quasi identisch sind. Das Dimer besitzt eine zweizählige Drehachse und ist in Abbildung 42A dargestellt. Von insgesamt 384 möglichen Aminosäureresten konnte die Elektronendichte für die AS Nummern 2-374 in einem Monomer und 2-379 im anderen Monomer interpretiert werden. Der Enzymkern nimmt die, für diese Proteinklasse, typische offene α/β Faltung an^{17, 106}. Diese besteht aus acht zentral parallel angeordneten β -Faltblättern, die von 14 α -Helices und 2 kleineren antiparallelen β -Schleifen umgeben werden (Abbildung 42B).

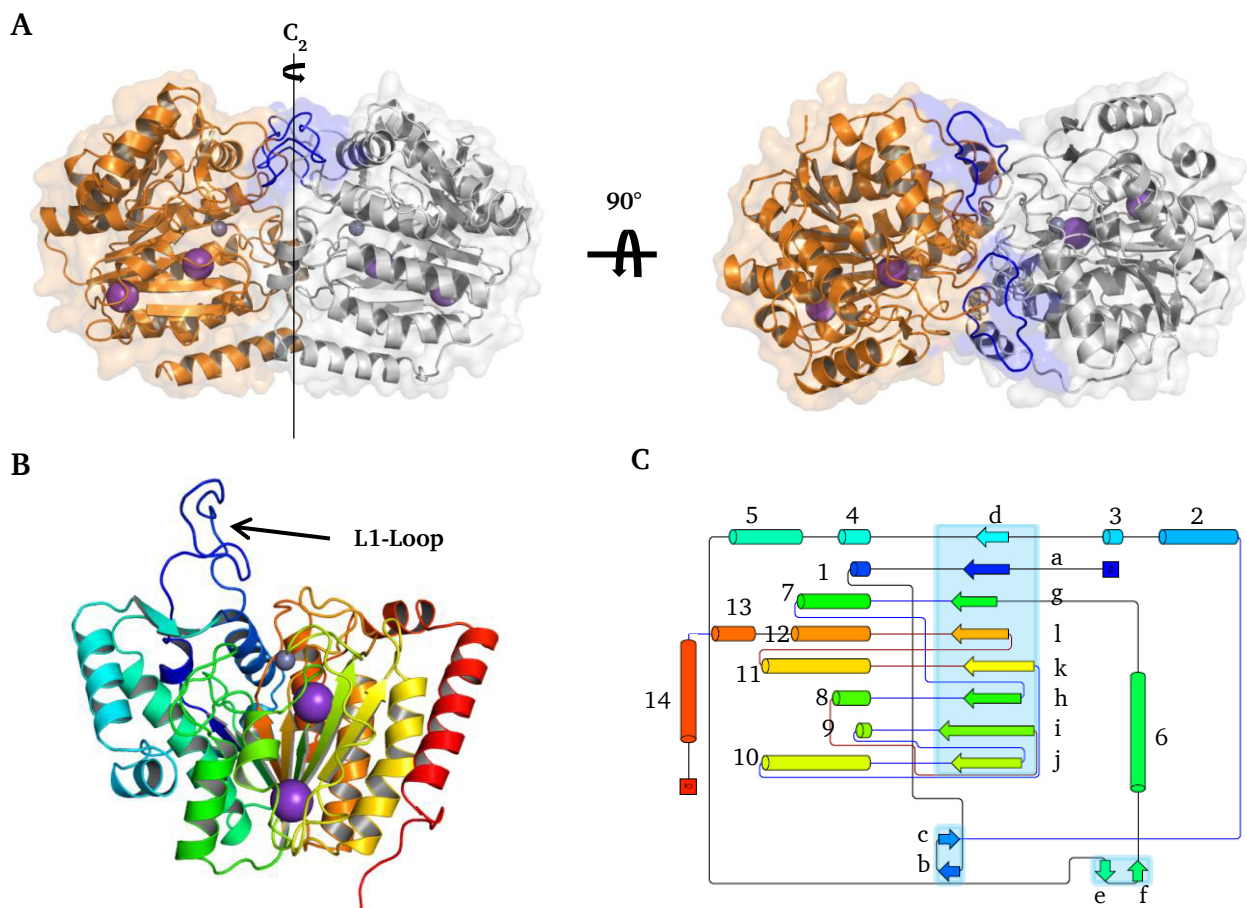


Abbildung 42: ASU des Enzyms PA3774. (A) zeigt das Homodimer des Enzyms in der asymmetrischen Einheit aus zwei verschiedenen Blickwinkeln. Ein Monomer ist orange, das andere grau eingefärbt. Die Zinkionen sind dunkelgrau, die Kaliumionen lila dargestellt. Das Dimer besitzt eine zweizählige Symmetrieachse. Die L1-Loop-Regionen, die hauptsächlich für die Assemblierung verantwortlich sind blau hervorgehoben. (B) zeigt ist die Faltung einer Untereinheit im Regenbogenfarbschema, dabei repräsentiert rot den C-Terminus und blau den N-Terminus. Das Enzym nimmt eine offene α/β -Faltung an. Der Pfeil zeigt den L1-Loop an, dessen Bedeutung in Abschnitt 4.9.3 näher erläutert wird. (C) zeigt ein detailliertes Topologie-Diagramm im selben Farbschema wie B. α -Helices sind von 1-14 nummeriert, β -Faltblätter von a-l. Die beiden β -Schleifen sowie die acht parallel angeordneten β -Faltblätter sind durch einen blauen Hintergrund hervorgehoben.

4.8.2. Beschreibung der Einheitszelle

Die Einheitszelle der tetragonalen Raumgruppe $P4_12_12$ besitzt die Maße $a=b=81.7 \text{ \AA}$, $c=205.9 \text{ \AA}$. Alle Winkel betragen 90° . In jeder Einheitszelle befinden sich jeweils acht der unter 4.8.1 beschriebenen Homodimere. Wie die Nahaufnahme der Abbildung 43 zeigt, lagern sich jeweils zwei, dieser Dimere zu Tetrameren zusammen. Diese Tetramere lagern sich wiederum an andere Tetramere an und bauen den Kristall auf. Das Tetramer ist auch die biologisch relevante Quartärstruktur in Lösung. Die legt eine Größenausschlusschromatographie, mit nachgeschalteter *multiangle laser light scattering* Messung (MALLS) nahe (Abbildung 43B).

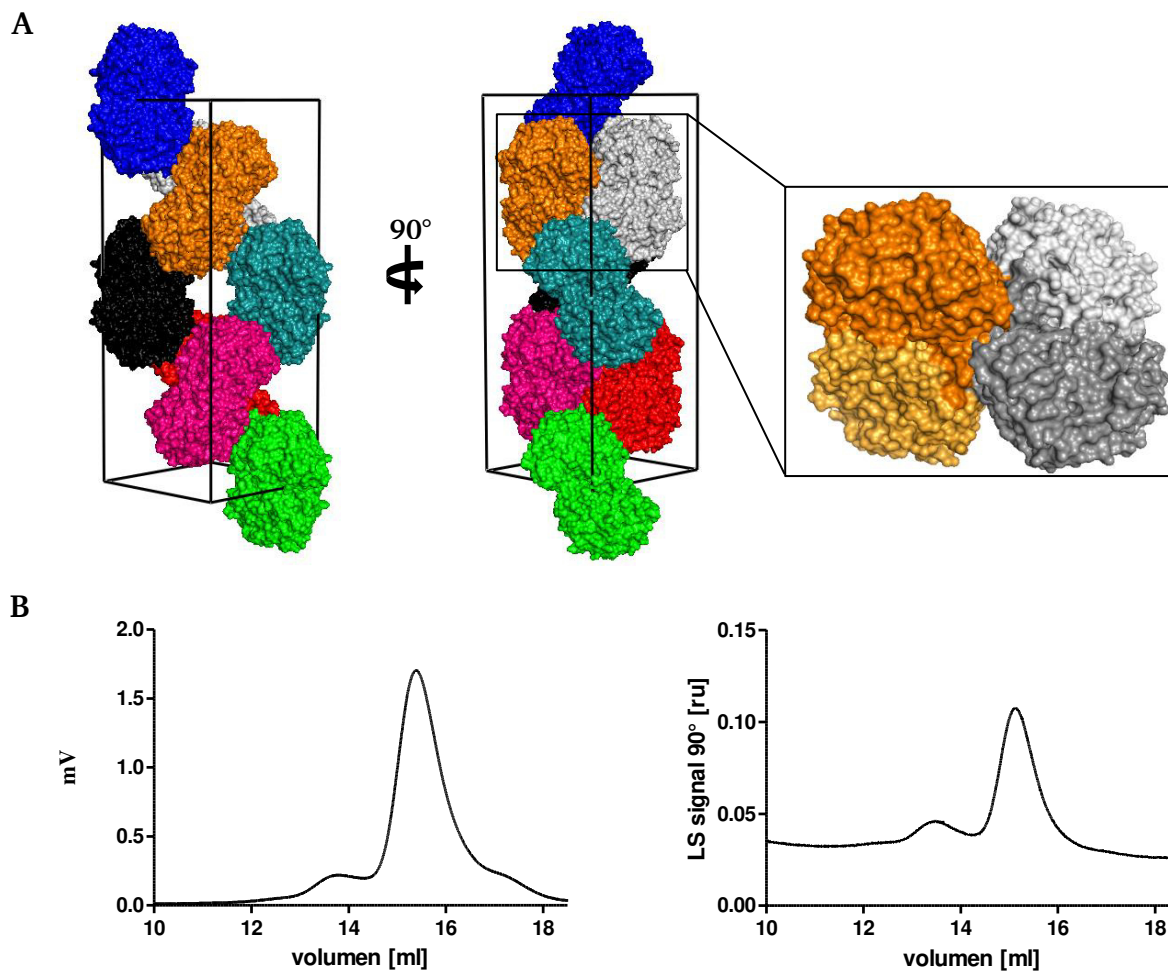


Abbildung 43: Einheitszelle des tetragonalen PA3774-Kristalls. Abbildung (A) zeigt die acht Dimere in der tetragonalen Einheitszelle (schwarz umrandet). Die Nahansicht zeigt wie sich jeweils zwei Dimere (orange/hellorange und grau/dunkelgrau) zu einem Tetramer zusammenlagern. Abbildung (B) zeigt die Ergebnisse der Größenausschlusschromatographie (links) mit anschließendem MALLS-Experiment (rechts). Die Größenausschlusschromatographie ergab ein Molekulargewicht von ca. 115 kDa, das anschließende MALLS-Experiment ein Molekulargewicht von ca. 156 kDa, was im Einklang mit einem Tetramer steht (erwartet Tetramer ca. 165 kDa, Dimer ca. 82 kDa).

4.8.3. Tetramerisierung hat entscheidenden Einfluss auf das Aktivzentrum

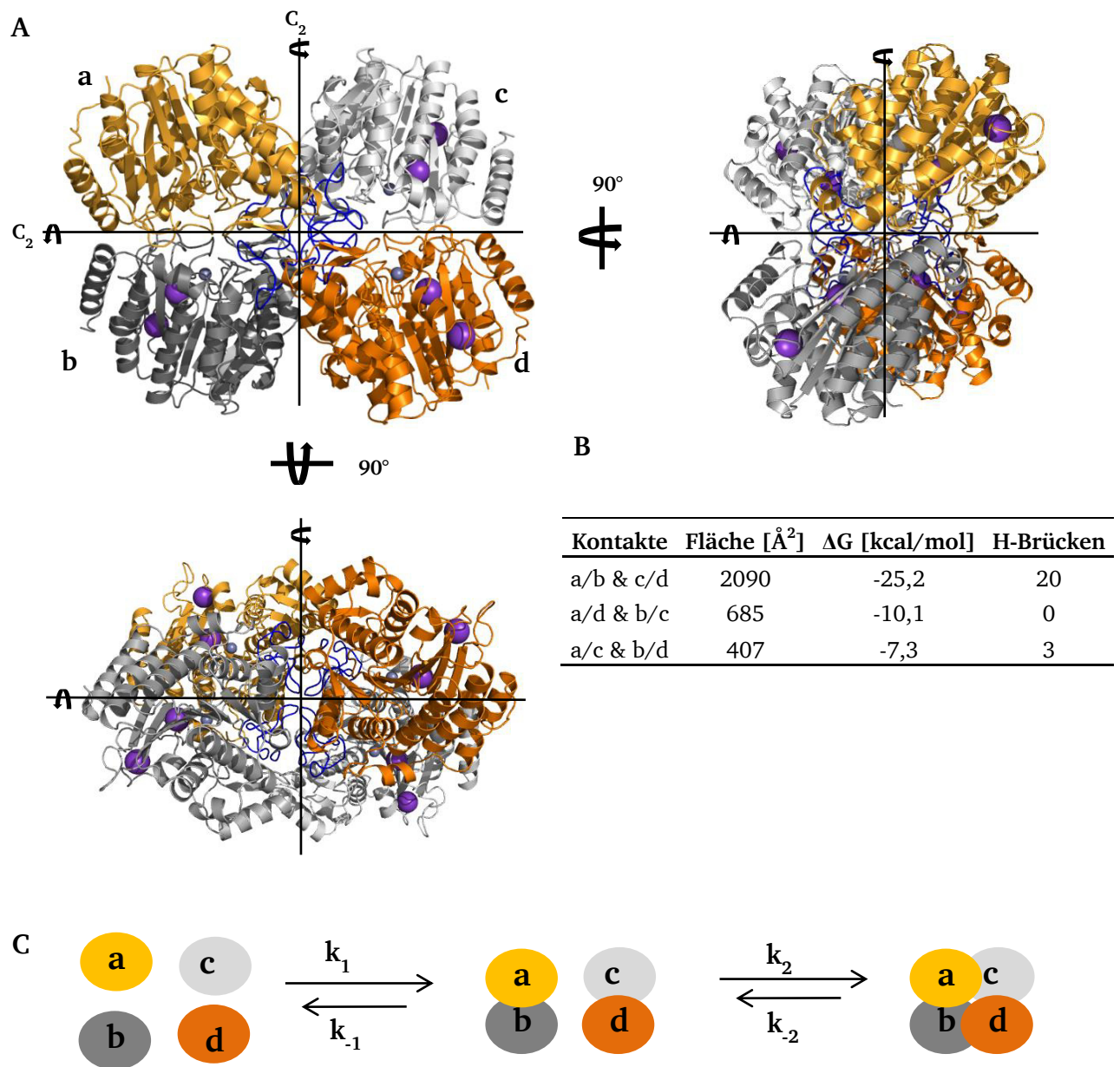


Abbildung 44: PA3774-Tetramer. Das PA3774-Tetramer besitzt eine D_2 -Symmetrie. Abbildung (A) zeigt das Tetramer aus drei verschiedenen Perspektiven, jeweils in Blickrichtung einer der drei orthogonalen Symmetrieachsen. Die „Kopf-an-Kopf-Dimere“ sind jeweils ähnlich eingefärbt (grau/orange und dunkelgrau/hellorange). Die für die Assemblierung verantwortliche L1-Loop-Region ist jeweils blau eingefärbt. Die L1-Loop-Region jeder Untereinheit ist in Richtung des Symmetriezentrums orientiert und bildet Kontakte zu jeder anderen Untereinheit. (B) Die in der Tabelle angegebenen Werte für die Kontaktflächen, H-Brücken und Dissoziationsenergien wurden mithilfe des Programms PISA berechnet¹⁰⁷. Abbildung (C) zeigt ein theoretisch vorhergesagtes Dissoziationsmuster, abgeleitet aus den Werten in (B).

Das PA3774-Tetramer weist eine D_2 -Symmetrie mit drei orthogonalen C_2 -Symmetrieachsen auf (Abbildung 44). Das Homotetramer ist aus jeweils zwei Homodimeren aufgebaut, die für die asymmetrische Einheit unter 4.8.1 beschrieben sind. (Das Dimer der asymmetrischen Einheit wird im Folgenden als „Kopf-an-Kopf-Dimer“ bezeichnet). Da die Kontaktfläche innerhalb der „Kopf-an-Kopf-Dimere“ deutlich größer ist, im Vergleich zu allen anderen Kontaktflächen, kann die Struktur auch als ein Dimer von Dimeren angesehen werden. Verantwortlich für die Oligomerisierung ist, im Vergleich zu anderen Enzymen dieser Klasse, ein ungewöhnlich langer L1-Loop. Dieser ist nicht nur für die Dimerisierung des „Kopf-an-Kopf-Dimeres“ verantwortlich, sondern auch für die Dimerisierung zweier „Kopf-an-Kopf-Dimere“. Alle L1-Loops sind in Richtung des Symmetriezentrums orientiert, an welcher Stelle alle Untereinheiten Kontakte zueinander ausbilden.

Von besonderer Bedeutung ist der Einfluss der Quartärstruktur auf das Aktivzentrum. Speziell die Assemblierung des „Kopf-an-Kopf-Dimeres“ nimmt direkten Einfluss auf die Struktur der Bindetasche. Wie Abbildung 45 demonstriert, wird der Eingang zum katalytischen Zentrum durch die Kontakte des „Kopf-an-Kopf-Dimeres“ signifikant limitiert. Die benachbarte Untereinheit schirmt die V-förmige Bindetasche von einer Seite partiell ab, woraus ein deutlich verengter Bindungskanal resultiert. Die Anzahl an möglichen Orientierungen der Substrate wird auf diese Weise drastisch eingeschränkt. Parallel wird auch die Umgebung am Rand der Bindetasche durch die Assemblierung maßgeblich verändert. Da dieser Bereich durch seine hydrophoben und hydrophilen Eigenschaften der Erkennung und Assoziation von Bindungspartnern dient, ist anzunehmen, dass diese spezifische Oligomerisierung ausschlaggebend für die Substraterkennung und Selektivität ist.

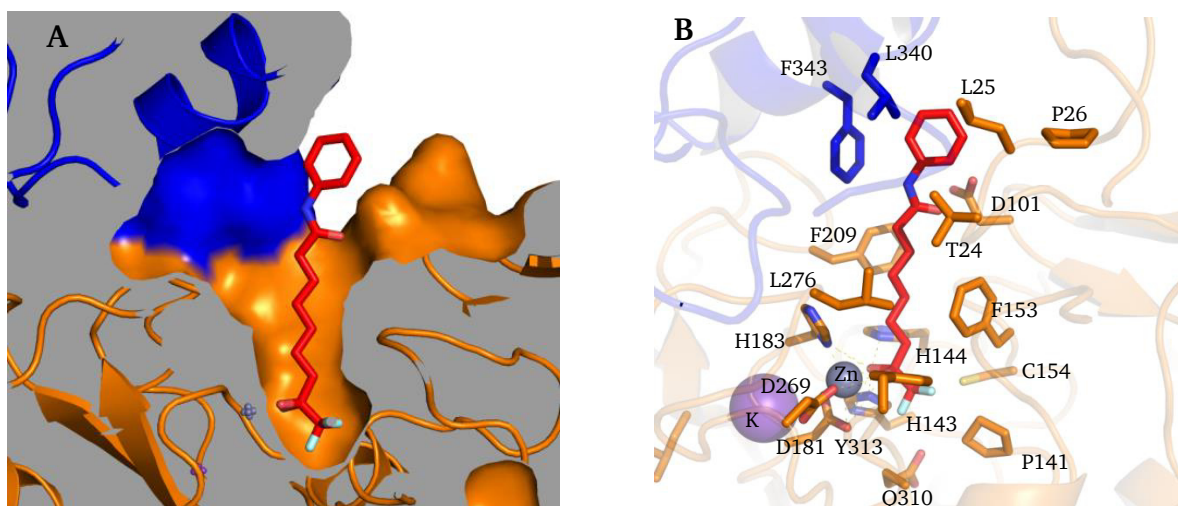


Abbildung 45: Bindetasche von PA3774. Die Abbildungen demonstrieren den Einfluss der Quartärstruktur auf das Aktivzentrum. (A) zeigt einen Querschnitt durch das Enzym mit gebundenem Inhibitor SATFMK (rot). Die v-förmige Bindetasche einer Untereinheit (orange), wird durch die benachbarte Untereinheit (blau) von einer Seite partiell abgeschirmt. (B) zeigt die Aminosäuren beider Untereinheiten, die den Bindungskanal formen (Farbschema identisches wie in A).

4.8.4. Beschreibung der Metallbindestellen

Das katalytische Zentrum zeigt das für diese Enzymklasse typische Motiv⁶¹. Das katalytische Zinkion wird trigonal-bipyramidal durch die Seitenketten Asp181, His183, Asp269 koordiniert. Die verbleibenden zwei Koordinationsstellen werden vom jeweiligen Liganden besetzt. In der Nähe des Zinkions befinden sich die für katalytische Aktivität essenziellen Seitenketten His143, His144 und Tyr313 (Vergleich Mutationsstudie Abschnitt 4.1.3). Diese sind bei allen HDAC-Enzymen der Klasse I sowie IIa hochkonserviert⁶¹ und bilden in den hier determinierten Strukturen Wasserstoffbrücken zum jeweiligen Liganden aus (In Abbildung 46 ist beispielhaft Acetat als Ligand gezeigt).

Neben der Zinkbindestelle finden sich zwei weitere Kaliumbindestellen. Die Erste ist 7,1 Å vom zentralen Zinkion entfernt. Das dortige Kaliumion wird durch die Carbonylgruppen des Proteinrückgrates der Aminosäuren Asp179, Asp181, His183 und Leu203 sowie den Sauerstoffatomen der Seitenketten von Ser203 und Asp179 oktaedrisch koordiniert. Diese Kaliumbindestelle hat einen stabilisierenden Einfluss auf das Aktivzentrum, da die Aminosäuren Asp181 sowie His183 ebenfalls das Zinkion koordinieren¹⁰⁸. Darüber hinaus stabilisiert das Asp179 die mechanistisch wichtige Aminosäure His143 über eine Wasserstoffbrücke. Dieses His143-Asp179 sowie das His144-Asn186 Paar werden in der Literatur als „charge-transfer-relay-system“ beschrieben¹⁰⁹ und ist typisch für Enzyme der Klasse IIa. Bei Enzymen der Klasse I findet sich ein Aspartat an Stelle des Asparagins²¹. Mutationen der Aminosäuren Aspartat und Asparagin wirken sich jeweils negativ auf die Aktivität aus¹¹⁰.

Die zweite Kaliumbindestelle befindet sich in der Nähe der Proteinoberfläche und ist 17 Å von der ersten Kaliumbindestelle entfernt. Das Ion wird durch Carbonylgruppen des Proteinrückgrates der Aminosäuren Val198 Tyr192, Arg195 und Phe227 sowie zwei Wassermolekülen oktaedrisch koordiniert. Laut Untersuchungen von Gantt *et al.* hat diese Bindestelle einen stabilisierenden Einfluss und wirkt sich aktivitätssteigernd aus¹⁰⁸.

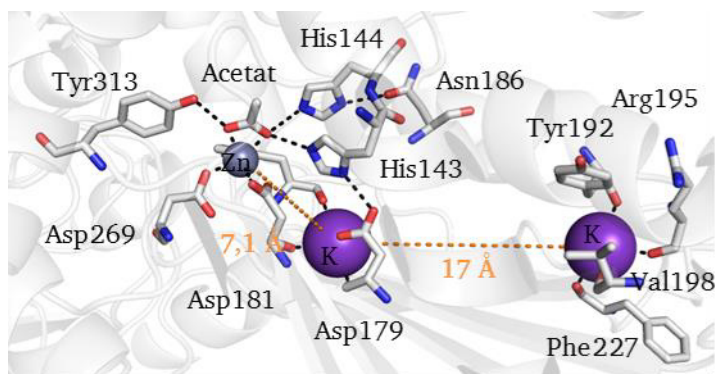


Abbildung 46: Detailansicht der Metallbindestellen. Die Abbildung zeigt die drei Metallbindestellen des Enzyms PA3774. Die schwarz gepunkteten Linien zeigen Wasserstoffbrücken und Metallkoordination, die orange gepunkteten Linien zeigen die internen Abstände der Metallzentren. Am Zinkion sind zusätzlich die katalytisch aktiven Seitenketten sowie das koordinierende Produkt Acetat gezeigt. Das His143-Asp179 sowie das His144-Asn186 Paar werden als „charge-transfer-relay-system“ in der Literatur beschrieben.

4.9. Bindung von Liganden an das Enzym PA3774

4.9.1. Ligandenfreie Struktur

Die erste Strukturaufklärung gelang mit dem nativen Kristall bei einer Auflösung von 2,3 Å. Am Zinkion des katalytischen Zentrums befindet sich eine zusätzliche Elektronendichte, die am besten durch zwei Wassermoleküle (W1 und W2) erklärt werden kann. Das Zinkion besitzt ein trigonalbipyramidales Ligandenfeld. Wie Abbildung 47 veranschaulicht, befindet sich etwas mehr Elektronendichte im Bereich von W1, was auf eine höhere Besetzung dieses Wassers innerhalb der Kristallstruktur im Vergleich zu W2 hindeutet. Eine Erklärung hierfür ist, dass W1 jeweils zwei Wasserstoffbrücken zu H143 sowie H144 ausbilden kann, während W2 lediglich eine zu Y313 ausbildet. Dies steht ebenfalls im Einklang mit den angenommenen Mechanismen (Vgl. Abbildung 3, Abschnitt 1.1.4), bei denen die Carbonylgruppe des Acetylsin-Eduktes das W2 am Zink verdrängt und anschließend von W1 hydrolysiert wird.

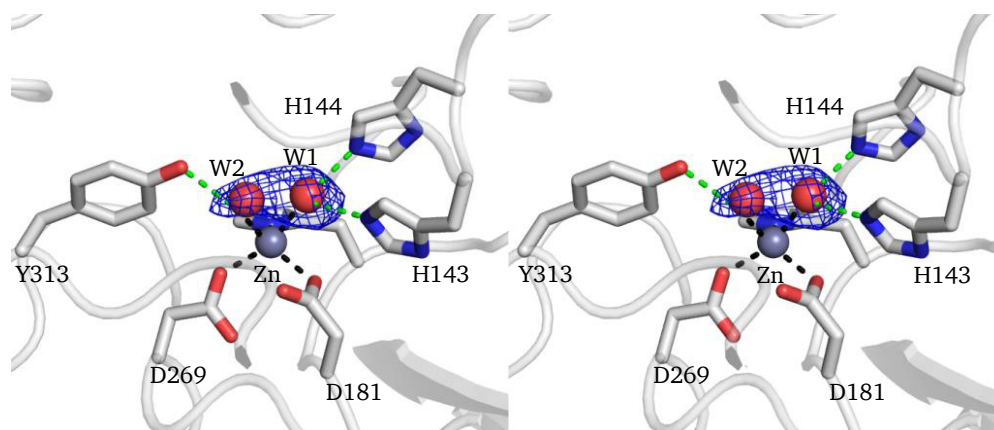


Abbildung 47: Stereobild der nativen PA3774-Struktur. Die Abbildung zeigt das katalytische Zentrum. Schwarz gepunktete Linien symbolisieren die Zinkkoordination, grün gepunktete Wasserstoffbrücken, das Zinkion ist als graue Kugel dargestellt. Die gezeigte Elektronendichte ist eine $F_o - F_c$ -Karte vor Einbau der Wassermoleküle, konturiert bei 3 σ .

4.9.2. Bindung des Inhibitors SATFMK

Der PA3774-SATFMK-Komplex besitzt eine Auflösung von 1,7 Å. Der Trifluormethylketone-Inhibitor zeigt eine hohe Affinität zum Enzym PA3774. Dies kommt in einem niedrigen IC_{50} -Wert von 9,7 nM zum Ausdruck (Abbildung 48B). Vor dem Hintergrund, dass bei der Bestimmung eine Enzymkonzentration von 10 nM verwendet wurde, könnte der wahre IC_{50} -Wert noch niedriger sein. Die gemessene Elektronendichte deutet darauf hin, dass der Inhibitor nicht als Keton, sondern als geminales Diol an das Aktivzentrum bindet. Eine ähnliche Bindung wurde für einen anderen Trifluormethylketon-Inhibitor an HDAC4 beobachtet (PDB 2VGJ)¹⁵. Das geminale Diol imitiert dabei quasi den tetraedrischen Übergangszustand, während der Hydrolyse. Die Bindungsgeometrie des Zinkions ist trigonal-bipyramidal. Die hohe Affinität des Inhibitors kann strukturell durch viele vorteilhafte Interaktionen im Bereich der Bindetasche erklärt werden. Zum einen akzeptieren die beiden Sauerstoffatome des geminalen Diols Wasserstoffbrücken von His143, H144 sowie Tyr313. Zum anderen kommt es durch die Trifluormethylgruppe zu vielen günstigen Wechselwirkungen innerhalb einer kleinen Kavität neben dem katalytischen Zentrum. Die Fluoratome bilden dabei polare Wechselwirkungen mit der Hydroxylgruppe von Tyr313, der Rückgrat Amidgruppe von Gly31, der Thiolgruppe von Cys154 sowie van der Waals Kontakte mit Pro141 aus (Abbildung 48A). Bei der HDAC Klasse IIb ist die innere Bindetasche hochkonserviert und Trifluormethylketone scheinen aussichtsreiche Kandidaten für die Entwicklung hochpotenter und selektiver Inhibitoren zu sein⁶¹.

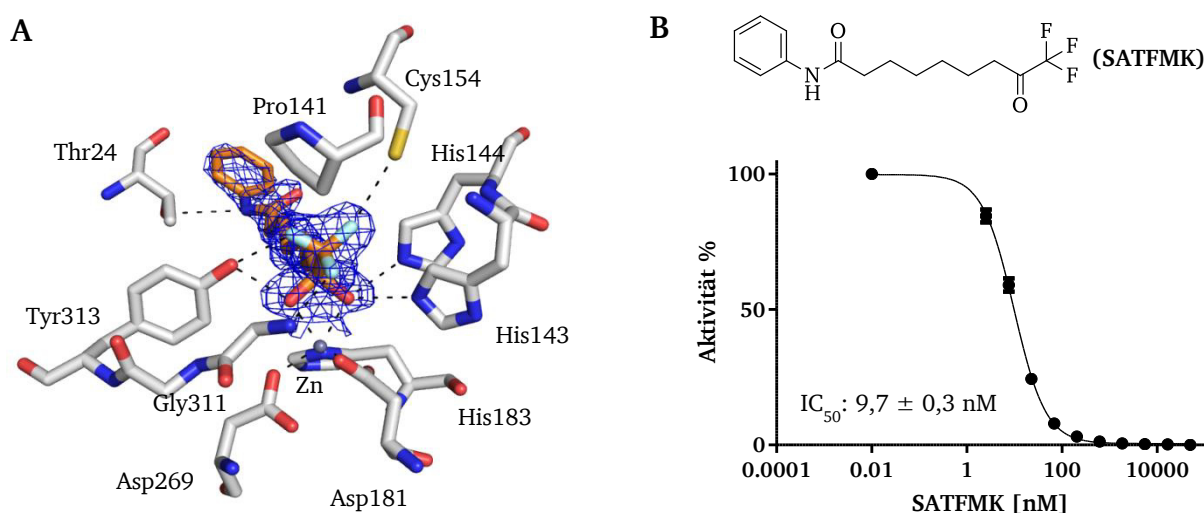


Abbildung 48: PA3774-SATFMK-Komplex. (A) zeigt alle günstigen Wechselwirkungen (schwarz gepunktete Linien) des Inhibitors SATFMK (orange) und dem Aktivzentrum von PA3774. Wie die dargestellte $2F_o - F_c$ -Elektronendichte (konturiert bei 1 σ) veranschaulicht, bindet der Inhibitor als geminales Diol an das Zinkion und imitiert dabei den tetraedrischen Übergangszustand während der Hydrolyse (B) zeigt die IC_{50} -Bestimmung. Zusätzlich ist die Ketonform des Inhibitors gezeigt. Durch den starken Elektronen zug der Fluoratome wird die geminale Diolform in wässriger Lösung begünstigt.

4.9.3. Bindung des Inhibitors CEW395

Für PA3774 konnte eine Struktur mit dem photoschaltbaren Inhibitor CEW395 in seiner *trans*-Konfiguration aufgeklärt werden (IC_{50} -Werte etc. siehe 4.4.1). Die determinierten IC_{50} -Werte dieser Verbindungen liegen in derselben Größenordnung wie vergleichbare Hydroxamsäure-Derivate. Die Bindung des Liganden an das zentrale Zinkion ähnelt dabei bekannten HDAC-Hydroxamsäure-Komplexen wie z.B.: PDB 1ZZ1 (HDAH)¹⁰⁴ oder 1C3S (HDL)¹⁷. Die hohe Affinität kann durch mehrere positive Wechselwirkungen, mit den mechanistisch essenziellen Seitenketten, erklärt werden. So bildet der Hydroxylamin-Sauerstoff eine Wasserstoffbrücke mit His143, der Hydroxylamin-Stickstoff eine Wasserstoffbrücke mit H144, während der Carbonyl-Sauerstoff eine Wasserstoffbrücke mit Tyr313 eingeht. Des Weiteren ist der innere Arylring des Inhibitors in einer Position um positive Π - Π Wechselwirkungen mit den gegenüberliegenden Phe209 und Phe152 auszubilden (Abbildung 49).

Im Gegensatz zur weitestgehend planaren Struktur von CEW65 bei FB188-HDAH (siehe 4.11.3) sind die beiden Arylringe des Inhibitors CEW395 leicht aus der Ebene verdreht. Die könnte auf sterische Wechselwirkungen, insbesondere der Methylgruppenreste am Pyrazolring mit der engen Bindetasche zurückzuführen sein. Allerdings gibt es auch Hinweise darauf, dass eine „verdrehte“ Konformation bei derartigen Azoverbindungen in polarer Lösung sogar energetisch begünstigt ist oder der Energieunterschied im Vergleich zur planaren Struktur zumindest vernachlässigbar ist¹¹¹.

Leider war es nicht möglich eine Struktur, mit dem Inhibitor in seiner *cis*-Konfiguration zu erhalten. Dies ist aufgrund der benötigten Inkubationszeit experimentell schwierig zu bewerkstelligen, da die Inhibitoren nach einiger Zeit wieder in die stabilere *trans*-Konfiguration relaxieren und selbst im photostationären Zustand nicht alle Moleküle in der *cis*-Konfiguration vorliegen (Vgl. 1.4)¹¹². Bei PA3774 zeigt der Ligand in seiner *trans*-Konfiguration zudem eine stärkere Inhibition. Die einzige Möglichkeit die *cis*-Konfiguration zu erhalten, wäre den bereits inkubierten Kristall mit geeigneter Wellenlänge zu bestrahlen. Versuche hierzu wurden zwar unternommen, allerdings schädigte das UV-Licht den Kristall so stark, dass eine Strukturlösung nicht mehr möglich war.

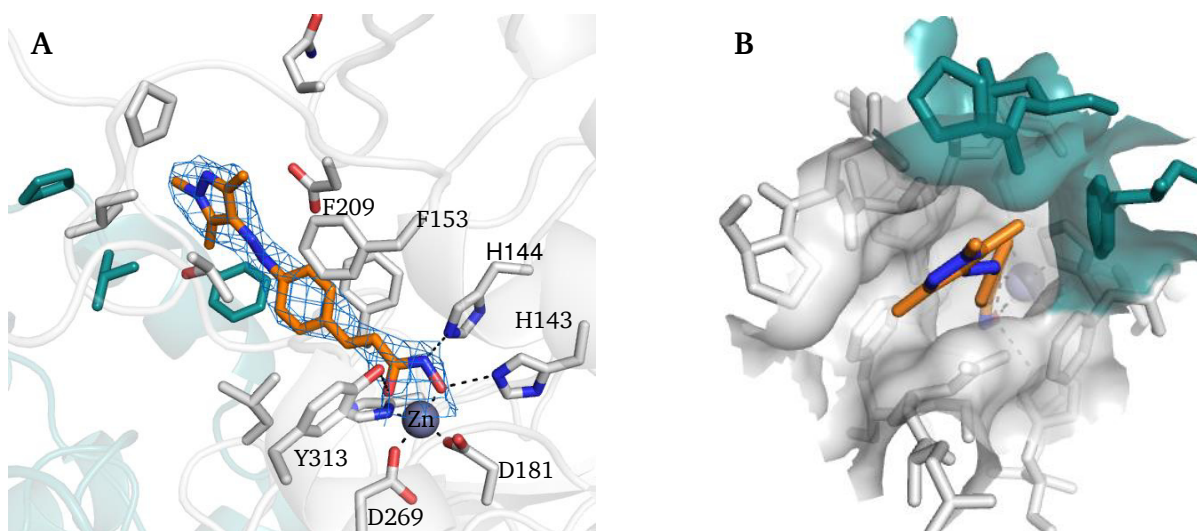


Abbildung 49: PA3774-CEW395-Komplex. (A) zeigt die Bindung des photoschaltbaren Inhibitors CEW395 in seiner *trans* Konfiguration im Aktivzentrum des Enzyms PA3774. Die Bindetasche aufspannende Seitenketten sind grau dargestellt. Türkis gefärbte Aminosäuren gehören zum benachbarten Monomer. Positive Interaktionen zwischen Enzym und Ligand sind als schwarz gepunktete Linien gekennzeichnet. Die gezeigte $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte des Liganden ist bei 1σ konturiert. (B) zeigt eine Draufsicht der Bindetasche. Es ist zu erkennen, dass die beiden Arylringe um die Stickstoffdoppelbindung leicht verdreht sind und von einer planaren Struktur abweichen.

4.9.4. Bindung des Reaktionsproduktes Acetat

Der Komplex aus dem Reaktionsprodukt Acetat und PA3774 besitzt eine Auflösung von $1,7 \text{ \AA}$, was eine sehr präzise Interpretation aller Seitenketten erlaubt. Daher wurde diese Struktur für die Beschreibung der Gesamtstruktur ausgewählt (siehe 4.9). Im katalytischen Zentrum ist das Zink Ion in trigonal-bipyramidal koordiniert (Abbildung 50). Die Sauerstoff-Zink-Abstände sind jeweils $2,1 \text{ \AA}$. Die Bindung ist quasi identisch zur Bindung von Acetat an die FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* (PDB 1ZZO)¹⁰⁴.

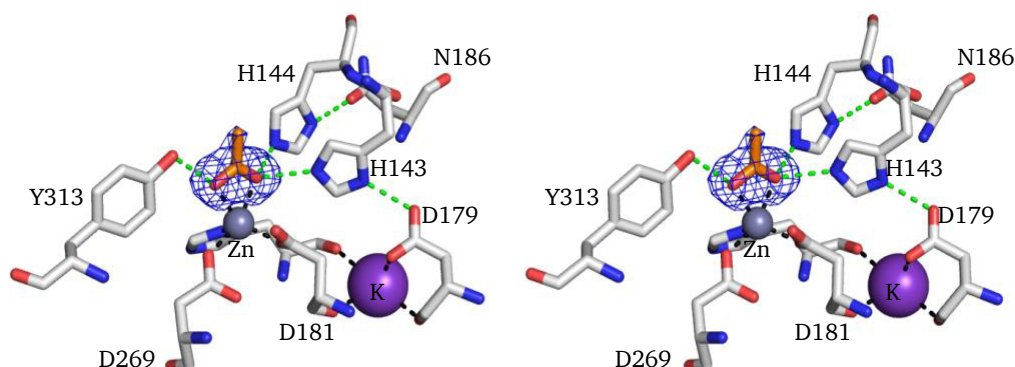


Abbildung 50: Stereobild des PA3774-Acetat-Komplexes. Gezeigt ist das katalytische Zentrum des Enzyms. Das zentrale Zinkion (grau) ist trigonal-bipyramidal koordiniert. H144-N186 und H143-D179 werden in der Literatur als „charge-transfer-relay-system“ betrachtet. Wasserstoffbrücken sind als grün gepunktete, Metallkoordination als schwarze gepunktete Linien dargestellt. Die gezeigte Elektronendichte ist eine $F_o - F_c$ -Karte konturiert bei 3σ , bevor Einbau des Liganden (orange).

4.9.5. Ligandenfreie PA3774-Mutanten

Die PA3774_{H143A}-Struktur besitzt bei einer Auflösung von 2,0 Å. Analog zur Wildtyp-Struktur sind zwei Wasser am katalytischen Zinkion gebunden. Das Rückgrat des Proteins bleibt durch die Mutation von Histidin zu Alanin unverändert. Dies zeigt, dass der unter 4.1.3 beobachtete Aktivitätsverlust ausschließlich auf die Seitenkette zurückzuführen ist und nicht etwa auf eine komplette Umfaltung der inneren Bindetasche (Abbildung 51A).

Die PA3774_{Y313F}-Struktur hat ebenfalls eine Auflösung von 2,0 Å. Auch hier finden sich jeweils zwei Wassermoleküle im Aktivzentrum. Einziger Unterschied zu Wildtyp-Struktur ist, dass die mutierte Aminosäure Phe313 zwei verschiedene Orientierungen einnimmt (Abbildung 51B). Entweder ist die Seitenkette, hin zum Zinkion (einwärts) oder weg vom Zinkion orientiert (auswärts). Diese „auswärts“-Konformation findet sich ebenfalls bei anderen Strukturen wie HDAC4¹⁵ und HDAC7¹⁶, bei denen das korrespondierende Histidin ebenfalls die Orientierung einnimmt. Des Weiteren fand sich auch in der APAH-Struktur aus *M. ramosa* (PDB 3Q9F)¹¹³ teilweise diese Orientierung des Tyrosins. In der betreffenden Publikation wurde ein „induced fit“-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem das Tyrosin erst nach Substratbindung von der „auswärts“ zur „einwärts“ Orientierung wechselt.

Interessant ist die leicht unterschiedliche Besetzung der Wassermoleküle am Zinkion beider Mutanten. Bei der PA3774_{H143A}-Struktur weisen beide Wassermoleküle in etwa die gleiche Besetzung auf, während bei der PA3774_{Y313F}-Struktur das Wasser W1 höher besetzt ist. Dies steht im Einklang mit den möglichen Wasserstoffbrücken. Während bei der PA3774_{Y313F}-Mutante „W1“ zwei Wasserstoffbrücken formen kann und „W2“ keine, ist das Verhältnis bei der PA3774_{H143A}-Mutante eins zu eins (Abbildung 52).

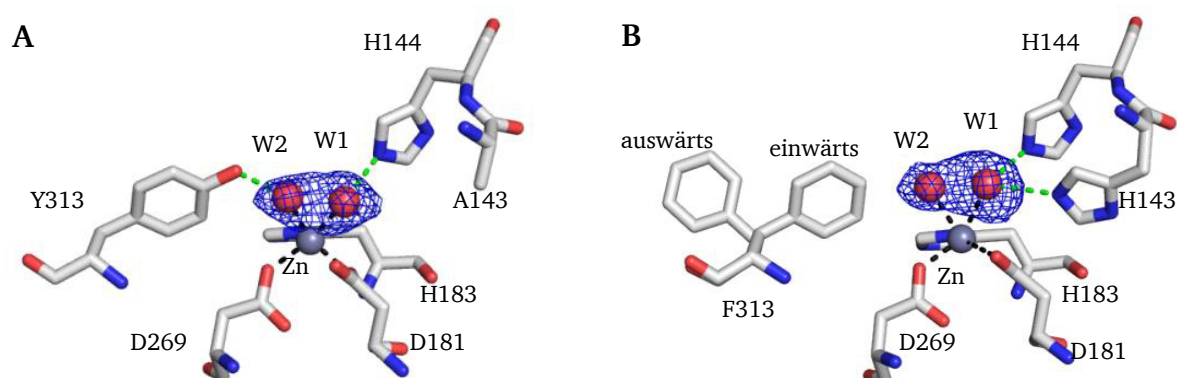


Abbildung 51: PA3774-Mutanten. (A) zeigt die PA3774_{H143A}-Struktur. Das Rückgrat des Enzyms bleibt durch die Mutation unverändert. (B) zeigt die PA3774_{Y313F}-Struktur. Das Phenylalanin 313 nimmt in dieser Mutante zwei verschiedene Orientierungen ein. Die gezeigte Elektronendichte ist eine $F_o - F_c$ -Karte, konturiert bei 3 σ , vor Einbau der jeweiligen Wassermoleküle.

4.9.6. Bindung des Inhibitors PFSAHA an die Mutante PA3774_{Y313F}

Der Inhibitor PFSAHA ist ein perfluoriertes Derivat des kommerziell erhältlichen Chemotherapeutikums SAHA (Strukturen siehe 8.2). Er ist hochaffin und selektiv gegenüber dem Enzym PA3774 mit einem IC₅₀-Wert von 62 nM. Gegenüber menschlichen HDACs weist dieser Ligand hingegen IC₅₀-Werte im μ M Bereich auf, wie z.B.: HDAC6 (11 μ M), HDAC1 (29 μ M), HDAC8 (17 μ M) oder HDAC7 (11 μ M)¹¹⁴.

PFSAHA ist eine Hydroxamsäure und komplexiert das Zinkion in analoger Weise wie andere Hydroxamsäure-Derivate, wie z.B.: HDAH (PDB 1ZZ1)¹⁰⁴ oder HDLP (PDB 1C3S)¹⁷. Der Hydroxylamin-Sauerstoff bildet eine Wasserstoffbrücke mit His143, während der Hydroxylamin-Stickstoff eine Wasserstoffbrücke mit H144 ausbildet (Abbildung 52). Im Gegensatz zur inhibitorfreien PA3774_{Y313F}-Struktur, nimmt das Phe313 in diesem Komplex exklusive die „auswärts“-Orientierung ein. Eine plausible Erklärung hierfür könnte die Abstoßung der voluminöseren Fluoratome sein. Es ist jedoch davon auszugehen, dass im Wildtyp das entsprechende Tyrosin die „einwärts“-Orientierung einnimmt und die Hydroxylgruppe des Tyrosins eine Wasserstoffbrücke zum Carbonyl-Sauerstoff des Inhibitors ausbildet, analog dem FB188-HDAH-PFSAHA-Komplexes (siehe 4.11.1).

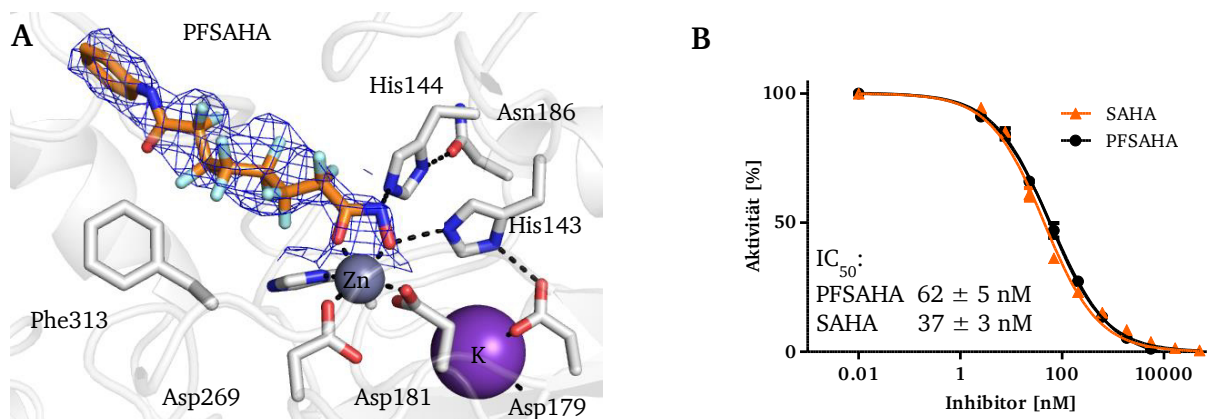


Abbildung 52: PA3774_{Y313F}-PFSAHA-Komplex. (A) zeigt den Inhibitor PFSAHA gebunden an das Enzym PA3774. Das Phe313 nimmt ausschließlich die „auswärts“ Orientierung ein. Die gezeigte 2F_o-F_c-Elektronendichtekarte des Liganden ist bei 1 σ konturiert. (B) zeigt die IC₅₀-Bestimmungen der Inhibitoren SAHA und PFSAHA auf das Wildtyp-Enzym. PFSAHA ist das perfluorierte Derivat des Inhibitors SAHA. Die Dosis-Wirkungskurven sind nahezu identisch.

4.10. Strukturbeschreibung des Enzyms FB188-HDAH und Vergleich mit PA3774

Das Enzym FB188-HDAH besitzt eine sehr hohe Ähnlichkeit mit dem unter 4.9 beschriebenen Enzym PA3774. In ihren Aminosäuresequenzen haben die beiden Proteine eine Übereinstimmung von ca. 48 %. Daraus resultiert eine ähnliche Sekundärstruktur sowie Tertiärstruktur inklusive konservierten katalytischem Zentrum und Metallbindestellen. Von großer Bedeutung ist insbesondere die hohe Homologie bezüglich der Quartärstruktur. Das Enzym FB188-HDAH weist wie das Enzym PA3774 eine deutlich verlängerte L1-Loop-Region auf, woraus eine analoge Assemblierung der Untereinheiten resultiert (Abbildung 53). Wie beim Protein PA3774 lagern sich jeweils zwei „Kopf-an-Kopf-Dimere“ zu einem Tetramer zusammen, welches eine D_2 -Symmetrie besitzt. Die komparable Tetramerisierung in beiden Enzymen, obwohl sie aus unterschiedlichen Organismen stammen, spricht für die in 4.9.3 getätigte Hypothese, dass es sich um ein funktionelles Tetramer handelt. Darüber hinaus kristallisiert das Enzym FB188-HDAH je nach Kristallisationsbedingungen in unterschiedlichen Raumgruppen^{91, 104, 112, 115}. Das Tetramer findet sich dabei unter allen Bedingungen, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass sich hierbei um die biologisch relevante Quartärstruktur handelt.

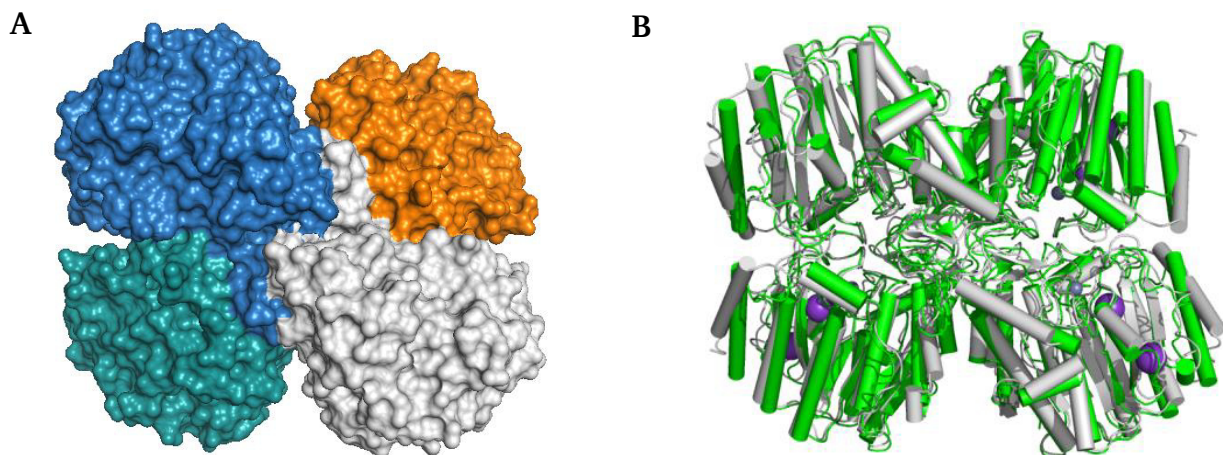


Abbildung 53: Struktur der FB188-HDAH. (A) zeigt Quartärstruktur des Enzyms FB188-HDAH in der Oberflächenrepräsentation. Jede Untereinheit des Tetramers ist in einer unterschiedlichen Farbe dargestellt. (B) Die Überlagerung des FB188-HDAH-Tetramers (grün) mit dem von PA3774 (grau) illustriert die hohe Homologie dieser beiden Enzyme.

4.11. Bindung von Liganden an das Enzym FB188-HDAH

4.11.1. Bindung des Inhibitors PFSAHA

Die Auflösung des FB188-HDAH-PFSAHA-Komplexes beträgt 1,4 Å. Die Bindung der Hydroxamatgruppe an das Zinkion ist analog zur Struktur von PA3774 mit gleichem Inhibitor. Das His143 bildet eine Wasserstoffbrücke zum Hydroxylamin-Stickstoff, das His142 zum Hydroxylamin-Sauerstoff und Tyr312 zum Carbonyl-Sauerstoff des Hydroxamats. Da die Struktur dieses Proteins mit dem unfluorierten Derivat SAHA bekannt ist (PDB 1ZZ1)¹⁰⁴, eignet sich dieser Komplex hervorragend zur Untersuchung des Einflusses der Fluoratome. Die Abbildung 54 verdeutlicht, dass die beiden Inhibitoren SAHA und PFSAHA quasi identisch an das Enzym binden. Durch die voluminöseren Fluoratome kommt es allerdings zu einer minimalen Aufweitung der Bindetasche. Der größte Unterschied findet sich bei Phe152. Im PFSAHA-Komplex finden sich zwei verschiedene Konformationen. Da der FB188-HDAH-SAHA-Komplex an dieser Stelle mit der nativen Struktur übereinstimmt, ist es anzunehmen, dass das Phe152 im PFSAHA-Komplex den voluminöseren Fluoratomen ausweicht. Überraschend ist, dass die Konformation der Alkylkette beider Inhibitoren ebenfalls identisch ist. Zwischen den Kohlenstoffatomen C3 und C4 kommt es bei beiden Inhibitoren zu einem eher ungünstigem *gauche*-gestaffelten Torsionswinkel (Abbildung 54C). Durch die Abstoßung der partiell negativ geladenen Fluoratome sollte diese Konformation in der perfluorierten Variante energieaufwendiger sein als in unfluorierten. Dies könnte erklären, warum PFSAHA bei FB188-HDAH weniger potent ist als SAHA.

Im Vergleich dazu zeigen die beiden Inhibitoren beim Enzym PA3774 quasi identische IC₅₀-Werte (Vgl. 4.10.6). Bei PA3774 ist die Alkylkette des PFSAHA *trans-gauche* gestaffelt, wodurch keine energetisch ungünstigen Torsionswinkel auftreten (Abbildung 54D). Auch die Bindetasche ist im Vergleich zu unfluorierten Inhibitoren bei PA3774 nicht aufgeweitet. Diese zwei Unterschiede könnten erklären, warum PFSAHA bei FB188 weniger wirksam ist als bei PA3774.

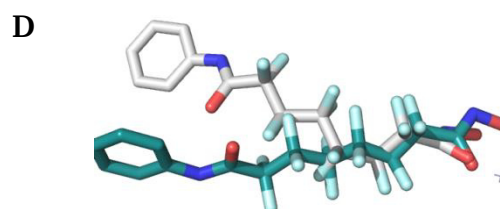
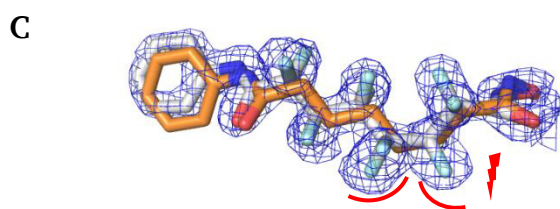
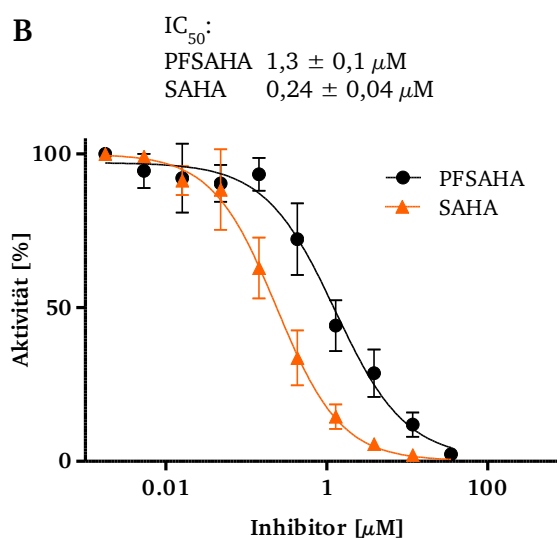
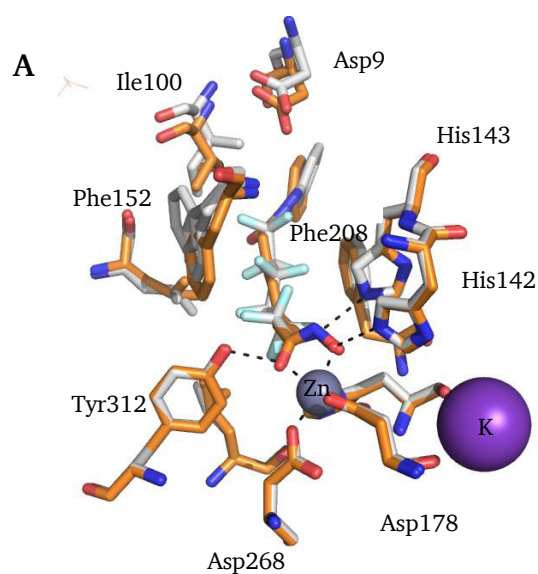


Abbildung 54: FB188-HDAH-PFSAHA-Komplex. (A) zeigt die Überlagerung des HDAH-PFSAHA-Komplexes (grau) und des FB188-HDAH-SAHA-Komplexes (orange). Durch die Perfluorierung des Inhibitors wird die Bindetasche im oberen Bereich leicht aufgeweitet. (B) zeigt die Dosis-Wirkungskurven der Inhibitoren SAHA und PFSAHA auf das Enzym FB188-HDAH. Der perfluorierte Inhibitor ist um ca. das 5-fache weniger potent. (C) zeigt die Überlagerung von PFSAHA (grau) und SAHA (orange) gebunden an FB188-HDAH. Zwischen C3 und C4 kommt es bei beiden Inhibitoren zu einem ungünstigen Diederwinkel. Die gezeigte $2F_o - F_c$ -Elektronendichtekarte gehört zu PFSAHA und ist bei 1σ konturiert. (D) Zeigt die Überlagerung der Konformation des PFSAHA bei HDAH (grau) bei PA3774 (grün). Im Gegensatz zum HDAH-Komplex treten im PA3774-Komplex keine ungünstigen Diederwinkel auf.

4.11.2. Bindung des Inhibitors SATFMK an die Mutante FB188-HDAH_{T101A}

Zusammen mit Christian Meyners, der sich mit der thermodynamischen Signatur der Ligandenbindung an das Enzym FB188-HDAH beschäftigte, wurde die von ihm erzeugte Mutante HDAH_{T101A} kristallisiert. Die Idee dahinter war, die potenziell stabilisierenden Wasserstoffbrücken der Aminosäure Thr101, am Eingang der Bindetasche, aufzuheben und die daraus resultierenden Auswirkungen auf die Ligandenbindung bzw. Thermodynamik, zu untersuchen. Da bereits eine Struktur des Wildtyps mit SATFMK bekannt war (PDB 2GH6)¹¹⁶, wurde dieser Inhibitor für Vergleichsexperimente ausgewählt. Der erhaltene Komplex besitzt eine Auflösung von $1,5 \text{ \AA}$ und ist in Abbildung 55A gezeigt. Die Bindung des Inhibitors ist dabei analog der Bindung an die Wildtyp-Struktur. Unterschiede in der Struktur zeigen sich wie vermutet am L2-Loop, an dem die Mutation eingeführt wurde. Wie Abbildung 55B verdeutlicht, rückt der L2-Loop aufgrund der fehlenden Wasserstoffbrückenbildung um $1,7 \text{ \AA}$

(gemessen am C α des Thr101). nach „außen“, wodurch sich die Bindetasche in diesem Bereich etwas öffnet. Ein Vergleich der atomaren Auslenkungsfaktoren (B-Faktoren), die als Maß für die Flexibilität interpretiert werden können, veranschaulicht die erhöhte Beweglichkeit in diesem Bereich. Der L2-Loop ist allerdings beim Wildtyp die flexibelste Region, was darauf schließen lässt, dass es sich hier um einen entscheidenden Faktor der Substraterkennung handelt.

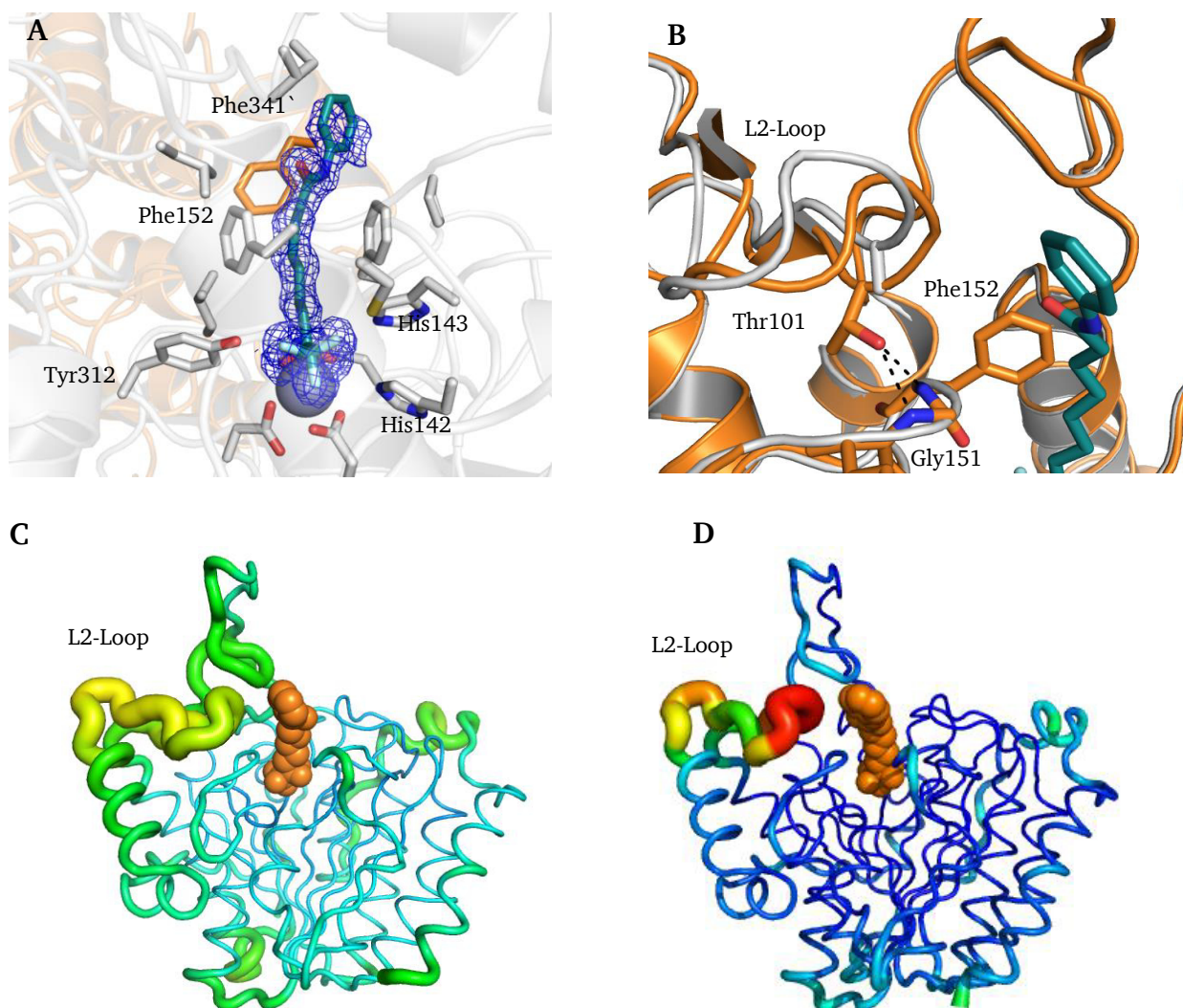


Abbildung 55: FB188-HDAH_{T101A}-SATFMK-Komplex. (A) zeigt die Bindung des Inhibitors SATFMK an das Enzym FB188-HDAH_{T101A}. Die gemessene Elektronendichtekarte des Inhibitors ist blau dargestellt (2F_o-F_c, konturiert bei 1 σ). Ein Monomer ist grau, das andere orange eingefärbt. Aufgrund der Dimerisierung und den daraus resultierenden Wechselwirkungen mit dem Inhibitor, nimmt dieser zum Kopfende hin eine gekrümmte Konformation ein. (B) zeigt eine Überlagerung der Wildtyp HDAH (orange) und Mutante HDAH_{T101A} (grau). Beim Wildtyp kann das Threonin potenziell zwei Wasserstoffbrücken zu den Rückgrat-Amid-Bindungen von Phe152 (Länge 2,8 Å) und Gly151 (Länge 3,1 Å) ausbilden (schwarz gepunktete Linien), wodurch der L2-Loop stabilisiert wird. Durch die Mutation fehlt diese Stabilisierung und der Loop rückt um 1,7 Å nach „außen“. Die fehlende Stabilisierung äußert sich ebenfalls in einem erhöhten B-Faktor (C) Wildtyp-HDAH (D) HDAH_{T101A}. Rote Bereiche geben hohe B-Faktoren bzw. erhöhte Flexibilität wieder, blaue weniger flexible Bereiche. Der Inhibitor SATFMK ist in C und D jeweils als Kalottenmodell (orange) dargestellt.

4.11.3. Bindung der photoschaltbaren Inhibitoren

Mit den unter Abschnitt 4.4 getesteten photoschaltbaren Inhibitoren wurden beim Enzym FB188-HDAH ebenfalls Kristall-*soaking*-Experimente durchgeführt und es gelang, die Komplex-Strukturen mit den Inhibitoren CEW395 und CEW65 aufzuklären. In den Strukturen findet sich ausschließlich das *trans*-Isomer (Abbildung 56). Die Bindung der beiden Inhibitoren untereinander ist sehr ähnlich und analog zum PA3774-CEW395-Komplex. Die kommensurablen Komplex-Strukturen dieser beiden Enzyme spiegeln sich auch in vergleichbaren IC_{50} -Werten wieder. Die Bindung der Hydroxamsäuregruppe an das zentrale Zinkion ist kongruent zu den bereits beschriebenen Komplexstrukturen mit anderen Hydroxamsäure-Derivaten, wie PA3774-PFSAHA oder FB188-HDAH-PFSAHA. Wie bereits beim PA3774-CEW395-Komplex beobachtet wurde, weicht auch bei hier der Arylazopyrazol-Inhibitor CEW395 etwas von der planaren Konformation ab. Im Gegensatz liegt der Azobenzol-Inhibitor CEW65 weitestgehend planar in der Bindetasche vor. Eine Erklärung hierfür könnten die voluminöseren Methylsubstituenten am Pyrazolring sein. Die daraus resultierenden sterischen Wechselwirkungen mit dem umgebenden Enzym, könnten für die leicht verdrehte Konformation verantwortlich sein. Diese sterischen Wechselwirkungen könnten auch ein Grund dafür sein, dass die Azobenzol-Derivate etwas potenter sind als die Arylazopyrazol-Derivate. Es ist aber ebenfalls vorstellbar, dass die verdrehte Konformation, ein Kristallisationsartefakt ist und in freier Lösung, bei dem das Enzym deutlich flexibler sein dürfte, nicht vorkommt.

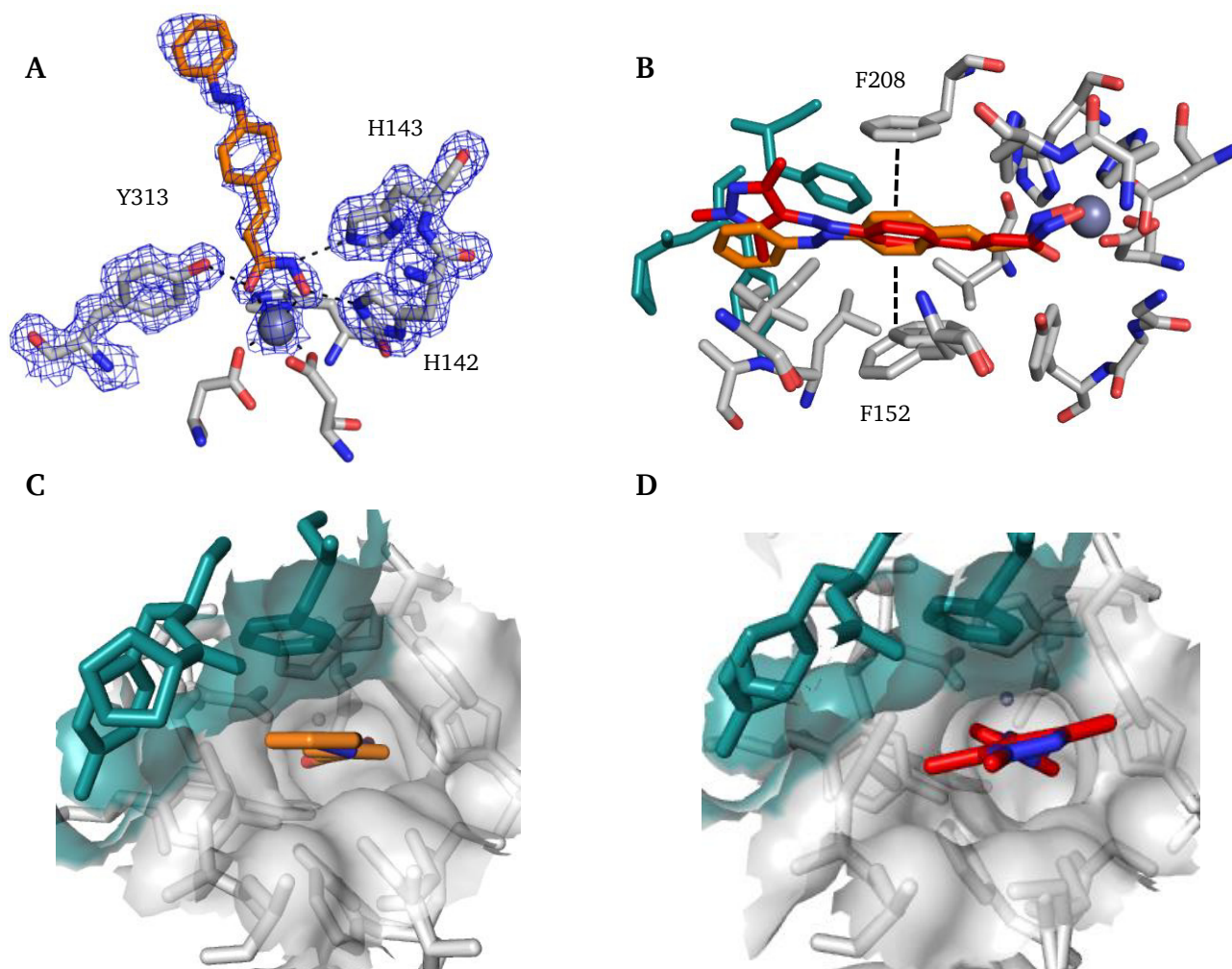


Abbildung 56: Bindung der photoschaltbaren Inhibitoren an das Enzym FB188-HDAH. (A) zeigt die Bindung des Azobenzol-Inhibitors CEW65 (orange) an das katalytische Zentrum. Positive Interaktionen der Hydroxamsäuregruppe sind durch schwarz gepunktete Linien gekennzeichnet. Zusätzlich ist die Elektronendichte ($2F_o - F_c$, σ 1) des Liganden sowie die der katalytischen Aminosäuren und des Zinkions blau dargestellt. Abbildung (B) zeigt eine Überlagerung der Inhibitoren CEW65 (orange) und CEW395 (rot). Die Bindetasche aufspannenden Aminosäuren sind grau dargestellt. Die türkisfarbenen Aminosäuren gehören zum benachbarten Monomer. Die hohe Affinität der Inhibitoren kann neben der Chelatierung des Zinkions auf das π -stacking der Arylringe (gepunktete Linien) zurückgeführt werden. (C) und (D) zeigen jeweils eine Draufsicht auf die Bindetasche. Die Konformation des Azobenzol-Inhibitors in (C) ist annähernd planar, während in (D) des Arylazopyrazol-Inhibitors aus der Ebene verdreht sind.

4.11.4. Bindung des Inhibitors PD 404,182

Der Inhibitor PD 404,182 ist heterocyclisches Iminobenzothiazin-Derivat und zeigt antimikrobielle und entzündungshemmende Eigenschaften^{117, 118}. In seiner Struktur unterscheidet sich dieser Inhibitor vollkommen von denen für diese Enzymklasse Klasse bekannten Trifluormethylketonen und Hydroxamsäuren. Er wurde in der LOPAC-Substanzbibliothek als selektiver Inhibitor für HDAC8 gefunden (IC_{50} : 10 nM)¹¹⁹. Auf das Enzym FB188-HDAH ist er allerdings weniger potent (IC_{50} : 0,41 μ M). Um den unbekannten Bindemechanismus zu untersuchen, wurden HDAH-Kristalle mit ca. 2 mM PD 404,182 inkubiert und die Struktur konnte bei einer Auflösung von 1,4 Å gelöst werden. Die

gemessene Elektronendichte zeigt, dass nicht der Inhibitor selbst, sondern ein Abbauprodukt davon kovalent an Cysteine bindet. Dies bestätigte die Vermutung von Ghebremariam *et al.*, der diesen Bindungsmechanismus für die Inhibition der Dimethylarginin-Dimethylaminohydrolase postulierte¹¹⁷.

Wie Abbildung 57 zeigt, bindet das Abbauprodukt an jedes oberflächlich zugängliche Cystein. Die Positionen sind allerdings nicht in der Nähe des katalytischen Zentrums und es ist strukturell nicht direkt ersichtlich, wie hierdurch eine Inhibition des Enzyms resultieren sollte. Es kann aber spekuliert werden, dass durch die Proteindynamik in freier Lösung temporär mehr Cysteine zugänglich werden, an die das Abbauprodukt irreversibel binden könnte. Eine kovalente Bindung an das im Aktivzentrum befindliche Cys153 hätte einen kompletten Verlust der Aktivität zur Folge.

Da Disulfidbrücken in Anwesenheit von Reduktionsmitteln nicht oder nur kurzfristig ausgebildet werden wäre anzunehmen, dass bei gegebener Konzentration an Reduktionsmitteln der Inhibitor weniger wirksam wäre. Dieser Annahme wurde durch Messungen an HDAC8 von C. Meyners bestätigt (bisher nicht publizierte Daten). Vor dem Hintergrund, dass im Cytosol reduktive Bedingungen vorherrschen, ist die Erkenntnis, dass es sich bei PD 404,182 um einen unselektiven Disulfidbrückenbildner handelt von weitreichender Bedeutung. Für diesen Inhibitor *in-vitro* gefundene Enzymtargets, sollten daher unbedingt bei reduktiven Bedingungen getestet werden. Darüber hinaus ist *in-vivo* davon auszugehen, dass dieser Inhibitor auf eine Vielzahl von Enzymen wirkt, was zu ungewünschten Nebenwirkungen in einer Therapie führen könnte.

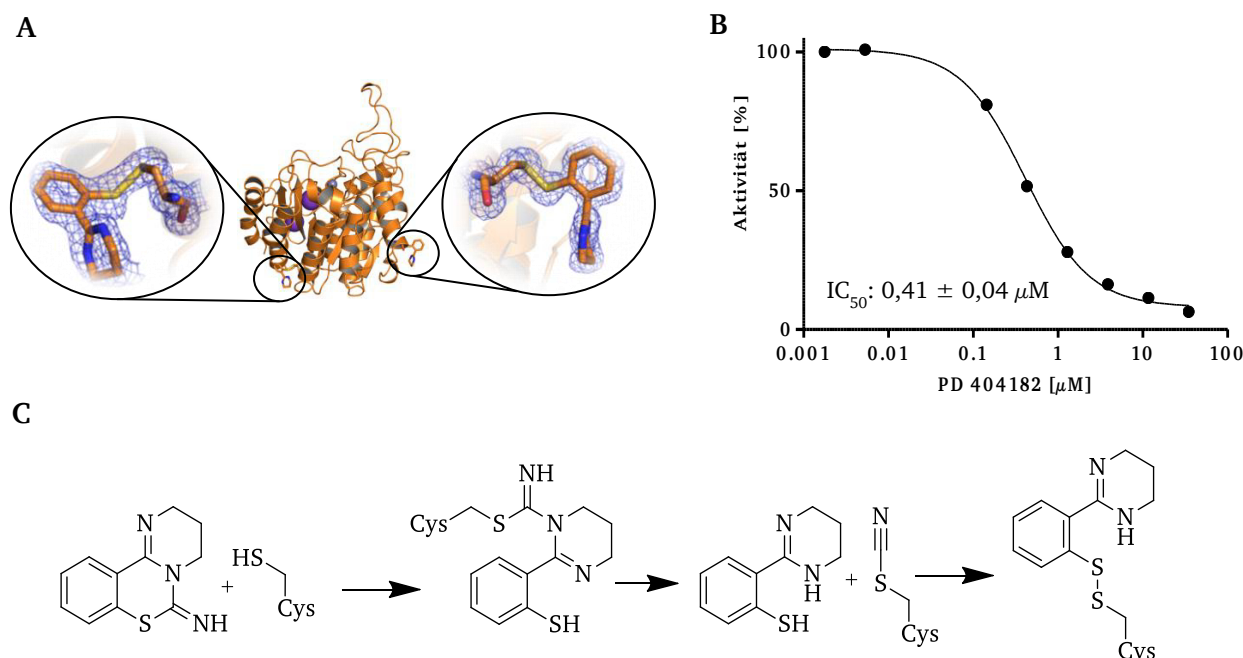


Abbildung 57: FB188-HDAH-PD 404,182-Komplex. (A) zeigt ein Monomer mit dem kovalent gebundenen Zerfallsprodukt des Inhibitors PD 404,182. Das Zerfallsprodukt findet sich an jedem oberflächlich zugänglichen Cystein. Die gezeigten Elektronendichten der Nahaufnahmen sind $2F_o - F_c$ -Karten konturiert bei 1σ . (B) zeigt die Bestimmung des IC_{50} -Wertes von PD 404,182 auf FB188-HDAH (C) zeigt den vorgeschlagenen Mechanismus des Zerfalls und Bindung des Inhibitors nach Ghebremariam *et al.*¹¹⁷.

4.12. Strukturelle Änderungen durch Ligandenbindung bei FB188-HDAH und PA3774

Werden die Strukturen des Enzyms FB188-HDAH im freien und im gebundenen Zustand verglichen, lässt sich zwischen einer geschlossenen und offenen Konformation unterscheiden. Die verantwortliche strukturelle Änderung findet sich innerhalb des L2-Loops am oberen Rand der Bindetasche (Abbildung 58). Befindet sich kein Inhibitor im Aktivzentrum, ragt das Ile100 nach innen und blockiert einen Großteil der Eingangskavität. Bei Bindung von Liganden nimmt diese Seitenkette eine andere Orientierung ein und der gesamte Loop rückt um ca. 2,8 Å (gemessen am C α des Ile100) nach „außen“. Dabei wird die H2-Helix ebenfalls in ihrer Position leicht verschoben. Alle anderen Bereiche des Enzyms bleiben dagegen nahezu unverändert (Abbildung 58).

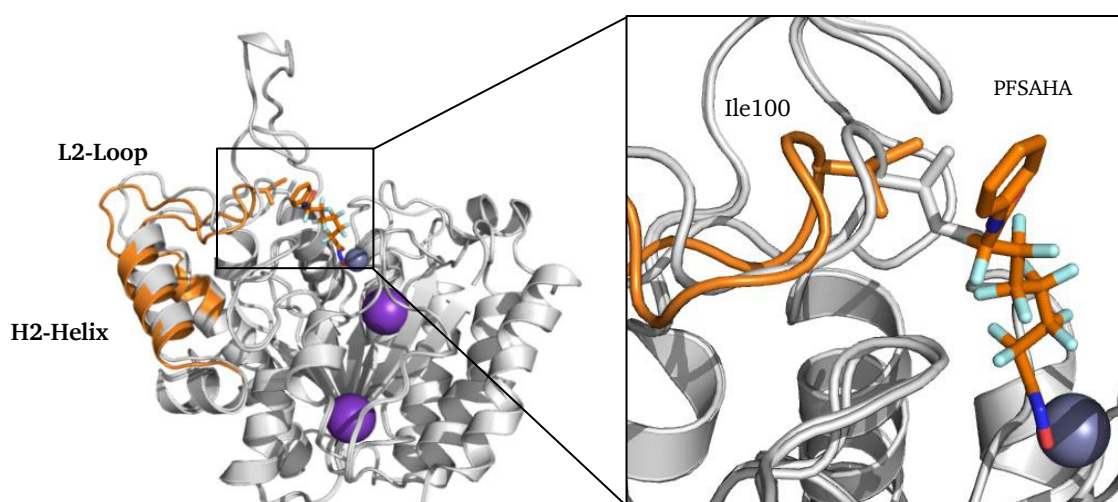


Abbildung 58: Überlagerung zweier HDAH-Strukturen im ungebunden und gebunden Zustand. In der Abbildung ist die native Struktur mit der von HDAH-PFSAHA überlagert. Sie illustriert die strukturelle Änderung des Enzyms durch die Bindung des Inhibitors PFSAHA. Befindet sich ein Ligand im Aktivzentrum, rückt der L2-Loop um 2,8 Å nach außen. Die Positionsverschiebungen im gebundenen Zustand sind orange dargestellt. Der Inhibitor PFSAHA ist ebenfalls orange dargestellt.

Im Vergleich zum Enzym FB188-HDAH ist diese Loop-Region beim Enzym PA3774 um eine Aminosäure verkürzt und das Enzym zeigt keinen „geschlossenen“ Zustand. Alle determinierten PA3774-Strukturen zeigen keine signifikanten Unterschiede unabhängig davon, ob ein kleiner Ligand wie Acetat oder ein großer wie SATFMK gebunden ist. Dies spiegelt sich auch in einem äußerst kleinen RMSD-Wert von 0,085 wieder. Gemäß den observierten B-Faktoren zeigt allerdings auch bei PA3774 die L2-Loop-Region erhöhte Flexibilität (Abbildung 59).

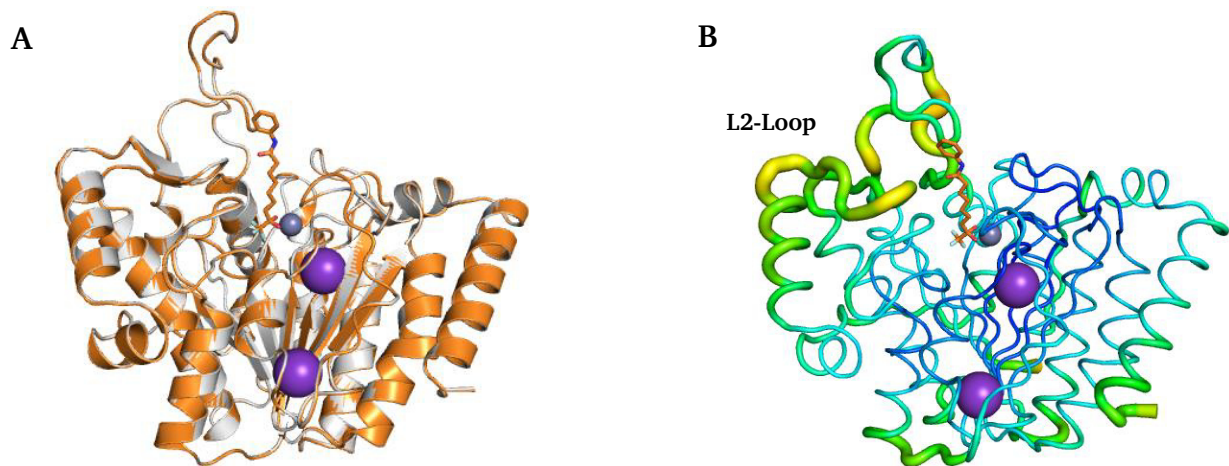


Abbildung 59: PA3774 nativ und bei Ligandenbindung. (A) zeigt eine Überlagerung des PA3774-Acetat-Komplexes (grau) und des PA3774-SATFMK-Komplexes (orange). Der RMSD-Wert beträgt 0,085. Das Enzym zeigt unabhängig vom der Größe des Liganden keine strukturellen Änderungen. (B) zeigt die B-Faktoren des Enzyms PA3774. Wie bei dem Enzym FB188-HDAH zeigt der L2-Loop die höchste Flexibilität (blau= niedriger B-Faktor, rot = hoher B-Faktor).

5. DISKUSSION

5.1. Vergleich mit anderen Vertretern der HDAC-Superfamilie

5.1.1. Multiples Sequenzalignment und Einordnung

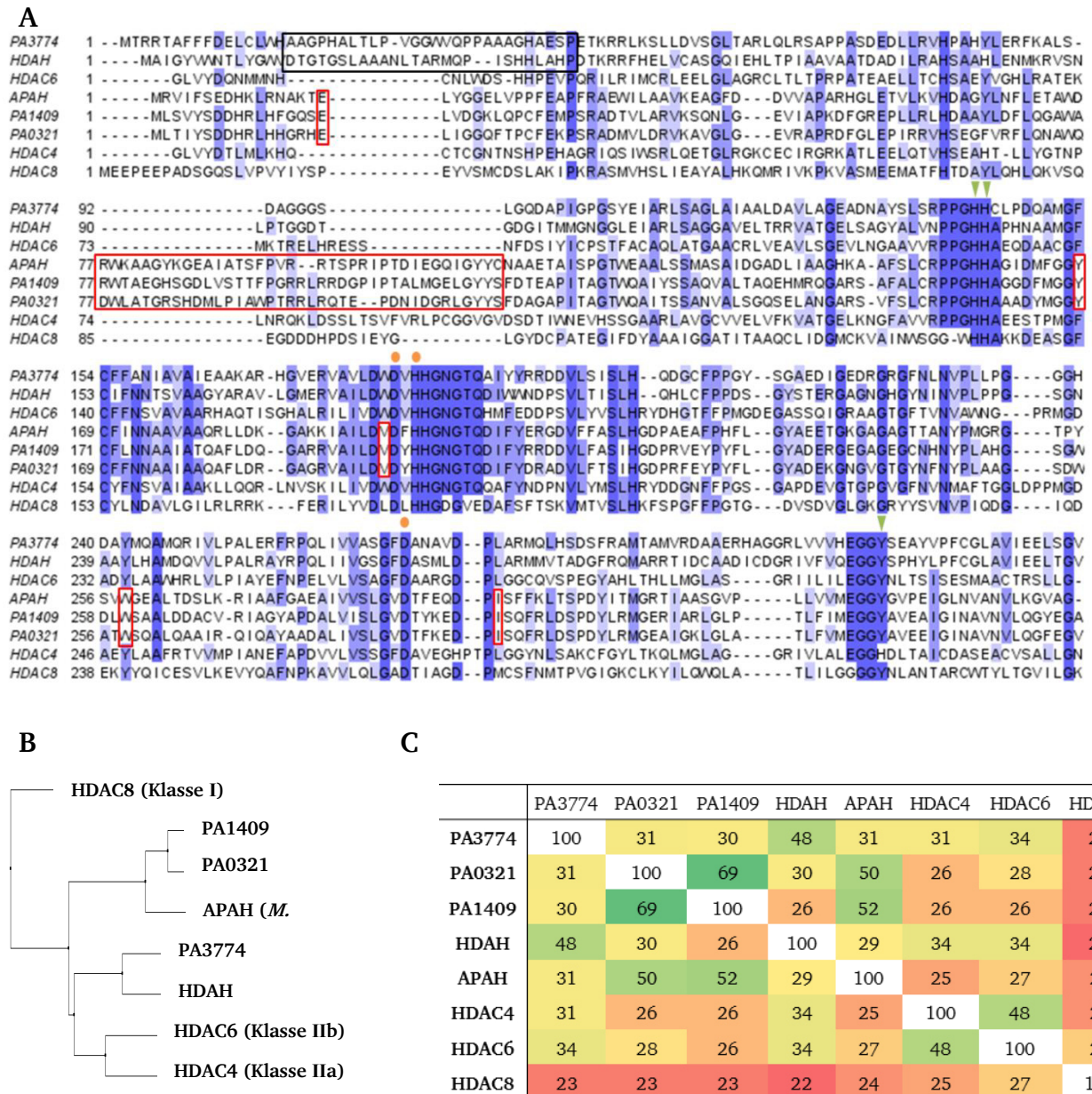


Abbildung 60: Sequenzvergleich. (A) zeigt das multiple Sequenzalignment von PA3774, PA0321, PA1409 aus *P. aeruginosa*, FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes*, APAH aus *M. ramosa* und den menschlichen HDACs 4,6 und 8. Orange Punkte zeigen die Aminosäuren an die das Zinkion komplexieren, grüne Dreiecke die der katalytisch aktiven AS. Die schwarz umrandeten AS umschließen den verlängerten L1-Loop, der einzigartig für PA3774 und FB188-HDAH ist. Die weitflächig rot umrandeten AS zeigen den verlängerten L2-Loop an, wie er ausschließlich bei APAHs vorkommt. Einzeln rot umrandete AS zeigen konservierte Abweichungen von APAHs im Vergleich zu allen anderen Enzymen der HDAC-Familie an. Das Alignment wurde mit T-Coffee durchgeführt¹²⁰, die Anfärbung entspricht dem BLOSUM62 Algorithmus¹²¹. (B) zeigt den *Neighbor-Joining-Tree* berechnet durch BLOSUM62. (C) zeigt die prozentuale Identitätsmatrix des Alignments. Grüne Felder spiegeln hohe, rote Felder niedrige Sequenzübereinstimmungen wieder.

Abbildung 60 zeigt ein Multiples Sequenzalignment (MSA) der in dieser Arbeit untersuchten Enzyme PA3774, PA1400, PA0321 sowie FB188-HDAH zusammen mit bekannten Vertretern der HDAC-Familie. Da diese Superfamilie sehr viele Enzyme umfasst, ist um die Übersicht zu gewährleisten, jeweils ein typischer Vertreter aus jeder Klasse ausgewählt. Da die menschlichen HDACs teilweise äußerst verlängerte C- und N-Termini aufweisen, sind im MSA nur deren katalytische Domänen gezeigt. HDAC8 ist als Vertreter der Klasse I, HDAC4 als Vertreter der Klasse IIa, die zweite Domäne von HDAC6 als Vertreter der Klasse IIb sowie die bakterielle APAH aus *M. ramosa* ausgewählt. Alle Kristallstrukturen der aufgeführten Enzyme oder zumindest deren katalytischen Domänen sind bekannt.

Das MSA, der daraus erstellte Homologie-Baum sowie die prozentuale Identitätsmatrix spiegeln die Homologie dieser Proteinfamilie wider. Metallbindestellen sowie das katalytische Zentrum sind streng konserviert. Die untersuchten bakteriellen Proteine werden, nach dem Stammbaum, allesamt der HDAC-Klasse II zugeordnet. PA0321 und PA1409, die wie in 4.3 dargelegt, erwiesenermaßen APAHs sind, ähneln sich untereinander zu 69 % und weisen gegenüber der APAH aus *M. ramosa* eine Identität von ca. 50 % auf. Die APAHs grenzen sich damit schon in ihrer Primärstruktur deutlich vom Enzym PA3774 ab, zu welchem beide eine vergleichsweise niedrige Identität von ca. 30 % aufweisen, was wiederum in Einklang mit unterschiedlichen Substratselektivitäten dieser Enzyme im Einklang steht. Die in 4.9 beschriebene hohe Ähnlichkeit in der Tertiär- sowie Quartärstruktur von FB188-HDAH und PA3774 spiegelt sich notwendigerweise auch in ihrer Primärstruktur wider (48 % Identität). Wie der strukturelle Vergleich zwischen HDAC8 und PA3774 demonstriert, zeigen selbst die hier am geringsten verwandten Enzyme immer noch eine hohe Übereinstimmung bezüglich der Tertiärstruktur (Abbildungen 60C und 61A).

5.1.2. Strukturelle Unterschiede zwischen HDAHs und APAHs

Bei genauer Betrachtung finden sich konservierte Unterschiede zwischen den beiden HDAH-Enzymen FB188 und PA3774 im Vergleich zu den APAHs, die erklären könnten, warum es sich bei PA3774 entgegen der Vorhersage um keine „echte“ APAH handelt. So fällt auf, dass der verlängerte L1-Loop, der als Hauptgrund für die Tetramerisierung ausgemacht wurde, ausschließlich bei FB188-HDAH und PA3774 vorhanden ist (schwarz umrandete Aminosäuren im MSA, Abbildung 60). Die APAH aus *M. ramosa* ist als Dimer beschrieben und unterscheidet sich in der Assemblierung der Untereinheiten deutlich von PA3774 und FB188-HDAH (Abbildung 61)⁸⁵. Verantwortlich für die Dimerisierung und der damit verbundenen Substratselektivität der APAH aus *M. ramosa* ist laut Lombardi *et al.* ein deutlich verlängerter L2-Loop⁸⁵. Zwar sind die Strukturen von PA0321 und PA1409 noch unbekannt, doch analog zur APAH aus *M. ramosa* findet sich auch dort ein nahezu identisch langer L2-Loop (im

MSA mit rot umrandete AS, Abbildung 60). Da bei allen anderen Enzymen diese Loop-Verlängerung nicht vorhanden ist, stellt diese ein Alleinstellungsmerkmal der APAHs dar. Dies unterstützt die Hypothese, dass dieser Loop mitverantwortlich für die Selektivität gegenüber acetylierten Polyaminen ist. Neben dem L2-Loop finden sich noch weitere hochkonservierte Merkmale, die unikal für APAHs sind. Im MSA sind diese ebenfalls rot umrandet. Bei vielen ist anhand der bekannten APAH-Struktur die Funktion nicht auf den ersten Blick ersichtlich, da sie in Bereichen vorkommen die weit vom katalytischen Zentrum entfernt sind und die Tertiärstruktur, im Vergleich zu den anderen Enzymen dieser Familie, dadurch nicht beeinflusst ist. Ein besonders markanter Unterschied findet sich allerdings innerhalb der Bindetasche. Dort befinden sich bei allen „Nicht-APAH-Enzymen“ dieser Klasse zwei hochkonservierte gegenüberliegende Phenylalanine (vgl. Abbildung 55), wodurch eine in diesem Bereich unpolare hydrophobe Bindetasche resultiert. Dies steht im Einklang mit einem acetylierten Lysin als Substrat, da dessen Alkylkette ebenfalls unpolar ist. Bei der APAH aus *M. ramosa* ist dagegen ein Phenylalanin gegen ein Tyrosin ausgetauscht, bei den APAHs aus *P. aeruginosa* sind sogar beide Phenylalanine gegen Tyrosine ausgetauscht, wodurch die Bindetasche deutlich polarer wird. Da Acetylpolyamine mehrerer polare Aminogruppen aufweisen, wäre dies eine plausible Erklärung dafür, warum diese Substrate von APAHs umgesetzt werden. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnten Tyrosin-Mutanten beispielsweise von PA3774 hergestellt und deren Aktivität gegenüber Acetylpolyaminen überprüft werden. Umgekehrt könnten auch die Tyrosine in den APAHs zu Phenylalaninen mutiert werden. Falls sich die Hypothese als richtig erweist, müsste die Aktivität gegenüber acetylierten Polyaminen daraufhin abnehmen.

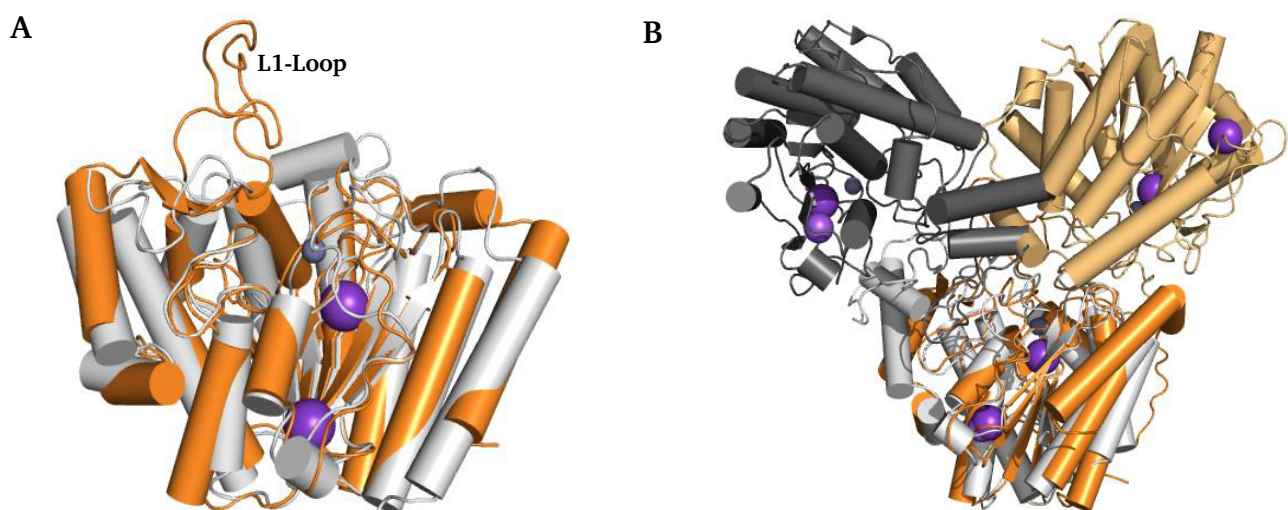


Abbildung 61: Vergleich von PA3774 mit verwandten Enzymen. (A) zeigt eine Überlagerung von PA3774 (orange) und HDAC8 (grau). Obwohl die Primärstruktur nur 20 % Identität aufweist, ist die Tertiärstruktur nahezu identisch. Augenscheinlicher Unterschied ist der verlängerte L1-Loop, der bei PA3774 zur Tetramerisierung führt, während HDAC8 in der Literatur als Monomer beschrieben ist und einen deutlich kürzeren L1-Loop aufweist. (B) zeigt eine Überlagerung des PA3774-„Kopf-an-Kopf-Dimeres“ (orange und hellorange) und des APAH-Dimeres aus *M. ramosa* (grau und dunkelgrau). Unterschiedliche Loop-Verlängerungen führen in diesen Enzymen zu verschiedenen Assemblierungen der Untereinheiten.

5.2. Biologische Funktion der drei HDAC-ähnlichen Enzyme aus *P. aeruginosa*

5.2.1. PA0321 und PA1409 sind Acetylpolyamin-Amidohydrolasen

Wie bereits erwähnt waren die drei untersuchten HDAC-Enzyme aus *P. aeruginosa* alle als putative APAHs vorhergesagt. Die Ergebnisse von 4.3 zeigten aber, dass die Vorhersage nur für PA1409 und PA0321 korrekt war.

Die *in-vitro*-Resultate wurden später durch *in-vivo*-Studien von unserem Kooperationspartner am KIT durch Wachstumstests von *P. aeruginosa* untermauert. Bei Anwesenheit von Glukose hatten die Inhibitoren SAHA und SATFMK keinen Einfluss auf das Wachstum von *P. aeruginosa*. Auch ein kompletter Gen-*Knock-out* dieser Enzyme schadete dem Bakterium nicht¹²². Dies lässt darauf schließen, dass diese Enzyme nicht überlebenswichtig unter diesen Bedingungen sind. Waren acetylierte Polyamine hingegen die einzig verfügbare Kohlenstoffquelle zeigten die Bakterien, die zusätzlich mit diesen Inhibitoren behandelt wurden, ein signifikant reduziertes Wachstum. Bei *Knock-out*-Mutanten von PA0321 und PA1409 kam das Wachstum teilweise gänzlich zum Erliegen. Die PA3774-*Knock-out*-Mutante zeigte hingegen nahezu keinen Unterschied zum Wildtyp¹²². Chou *et al.* zeigten durch DNA-Microassay-Analysen zudem, dass die Genexpression von PA1409 und PA0321 durch exogen zugeführtes Acetylputrescin 74-fach gesteigert wurde⁷⁴. Zusammengenommen deutet alles darauf, dass die Deacetylierung von acetylierten Polyaminen die Hauptfunktion dieser beiden Enzyme darstellt. Wie sich herausstellte, ist *P. aeruginosa* mithilfe dieser beiden Enzyme sogar in der Lage exklusiv mit acetylierten Polyaminen als einziger Nahrungsquelle auszukommen.

Es wird allgemein angenommen, dass die Acetylierung von Polyaminen die Funktion hat, überschüssige Polyamine in eine physiologisch inerte Form zu überführen, um das Gleichgewicht intrazellulärer Polyamine aufrecht zu erhalten¹²³. Dazu passt auch der Befund, dass sich hohe Konzentrationen von Acetylpolyaminen wieder inhibierend auf PA0321 und PA1409 auswirken. Dies könnte verhindern, dass der interzelluläre Polyamin-Spiegel zu hoch und somit schädlich für den Organismus wird.

In *E. Coli* beispielweise wird die Acetylierung von Polyminen durch das Enzym Spermidin-Acetyltransferase (SpeG) katalysiert¹²⁴ und die erhaltenen Acetylpolyamine im Anschluss ausgeschieden. In *E. Coli* finden sich keine vergleichbaren APAH-Enzyme, was darauf schließen lässt, dass dort einmal acetylierte Polyamine nicht wiederverwendet werden. Wie demonstriert ist *P. aeruginosa* mit seinen APAHs dazu in der Lage. Umgekehrt findet sich in *P. aeruginosa* kein vergleichbares SpeG-Enzym. Es ist allerdings davon auszugehen, dass dieser Prokaryot durch seine enorme Vielfalt an Stoffwechselwegen in der Lage ist, die Polyamin-Homöostase anderweitig aufrecht zu erhalten⁷⁴.

5.2.2. PA3774 ist eine Histon-Deacetylase-ähnliche Amidohydrolase

Das natürliche Substrat von PA3774 konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Die hohen Umsatzraten gegenüber artifiziellen HDAC-Substraten deuten darauf hin, dass es sich um Lysin-acetylierte Proteine handelt. Die (De)acetylierung von bakteriellen Proteinen ist Gegenstand aktueller Forschung und eine Vielzahl von Untersuchungen deutet darauf hin, dass diese Art der posttranslationalen Modifikation in Prokaryoten eine ähnliche Rolle spielt wie in Eukaryoten¹²⁵. So wird die Acetylierung von Proteinen beispielsweise in Zusammenhang mit regulatorischen Prozessen wie der Translation, Transkription oder Stressantwort bei Bakterien in Verbindung gebracht¹²⁵⁻¹²⁷. Auch in *P. aeruginosa* wurden in einer kürzlich veröffentlichten Studie insgesamt 320 acetylierte Proteine identifiziert. Darunter Virulenzfaktoren, Enzyme, die in der Biosynthese von Lipopolysaccharide involviert sind sowie DNA-Bindeproteine (HUs)¹²⁸. Es wird vermutet, dass diese HU-Proteine in Prokaryoten eine ähnliche Rolle wie Histone in Eukaryoten übernehmen¹²⁹. Aufgrund der Analogie zu den Histon-Deacetylasen wäre es verlockend zu spekulieren, ob diese DNA-Bindeproteine die natürlichen Substrate von PA3774 darstellen.

Aufgrund der hohen strukturellen Ähnlichkeit zur FB188-HDAH aus *Bordetella/Alcaligenes* wäre es darüber hinaus naheliegend anzunehmen, dass diese beiden Enzyme in ihren Organismen vergleichbare Aufgaben bzw. Substrate haben. Leider ist das natürliche Substrat der FB188-HDAH ebenfalls unbekannt. Untersuchungen zeigten aber zumindest, dass FB188-HDAH die höchsten Aktivitäten gegenüber artifiziellen acetylierten Lysin-Substraten aufweist, die mindestens eine basische Aminosäure in direkter Nachbarschaft besitzen¹³⁰. Nielsen *et al.* spekulierten, dass es sich um das Protein FtsZ handelt, ein bakterielles Tubulin¹⁰⁴. Diese Annahme begründete sich daraus, dass Tubulin ein Substrat der HDAC6 darstellt¹³¹, welches die größte Ähnlichkeit mit bakteriellen HDAHs aufweist. Ein Nachweis für diese Hypothese wurde allerdings nicht erbracht¹⁰⁴.

Als weiterführende Versuche könnten Westernblots mit Anti-Acetylsin-Antikörpern dienen, um acetylierte Proteine in *P. aeruginosa* aufzufinden. Eine zuvor mit PA3774 inkubierte Vergleichsprobe könnte zeigen, welche Proteine Substrate für dieses Enzym darstellen. Anschließend könnte eine massenspektroskopische Analyse die Proteine identifizieren.

Zusammengenommen sollte PA3774 allgemein als eine **Histon-Deacetylase-ähnliche Amidohydrolase** (HDAH) klassifiziert werden, bis das oder die natürlichen Substrate gefunden werden.

5.2.3. Mögliche Gründe für zwei APAH-Isoformen in *Pseudomonas aeruginosa*

Die beiden APAHs aus *P. aeruginosa* unterscheiden sich dahingehend, dass PA0321 lediglich die kleineren Acetylpolyamine Acetylputrescin und Acetylcadaverin umsetzt, während PA1409 zusätzlich in der Lage ist, die langkettigen Acetylspermin und Acetylspermidin zu metabolisieren. Beim Vergleich der Aktivitäten, fällt auf, dass PA1409 gegen alle Substrate das aktivere Enzym darstellt. Vor diesem Hintergrund erscheint das Enzym PA0321 etwas redundant und wirft die Frage auf, warum das Bakterium zwei Isoformen besitzt, während sich beispielsweise im Genom von *M. ramosa* lediglich ein *apha*-Gen findet¹³². Die Gründe hierfür könnten mannigfaltig sein und es kann an dieser Stelle nur spekuliert werden.

Im Operon von PA1409 findet sich noch ein weiteres Gen, welches für ein putatives periplasmatisches Putrescin/Spermidine-Bindeprotein kodiert^{36, 74}. Im Operon von PA0321 befindet sich noch ein weiteres Gen, welches für ein nicht näher definiertes Transportprotein codiert³⁶. Es ist naheliegend, dass die unterschiedlichen Operons im Zusammenspiel mit den unterschiedlichen Substratspezifitäten der beiden APAHs, eine differenziertere Steuerung des Stoffwechsels erlauben als eine APAH allein. Da *P. aeruginosa* generell eine große Vielfalt an Stoffwechselwegen aufweist, was ein Hauptgrund für dessen große Anpassungsfähigkeit gegenüber verschiedenen Umweltbedingungen ist^{36, 133}, wäre dies eine mögliche Erklärung^{36, 133}.

Ein weiterer Vorteil zweier Isoformen wäre, dass bei einer Funktionsverlustmutation einer APAH, immer noch die Andere dessen Aufgabe übernehmen könnte. Diese Argumentation trifft allerdings auf jedes beliebige Enzym zu und erscheint etwas zu einfach.

Die Aminosäuresequenzen der beiden APAHs aus *P. aeruginosa* zeigen eine Identität von ca. 70 %. Neben dem offenkundig gemeinsamen evolutionären Ursprung ist dies ein Indiz dafür, dass sich diese beiden Isoformen im Laufe der Evolution getrennt haben. So wäre naheliegend, dass das *apha*-Gen im Verlauf der Evolution dupliziert wurde. Dies stellt einen normalen evolutionären Vorgang dar und hat den Vorteil, dass ein Gen frei mutieren kann, während das Andere seine ursprüngliche Funktion beibehält. So entstehen immer wieder neue Enzyme mit neuen Funktionen¹³⁴. Da PA1409 das aktivere Enzym mit der größeren Substratvielfalt ist und mehr orthologe Gene innerhalb der *Pseudomonaden* gefunden werden, könnte in diesem konkreten Fall spekuliert werden, dass dieses Gen das ursprüngliche war und *pa0321* durch Genduplikation entstanden ist. PA0321 könnte sich daraufhin auf kleineren Acetylpolyamine spezialisiert haben, was unter bestimmten Umständen ein Vorteil sein könnte. Weiterführend ist denkbar, dass es bereits jetzt in der Lage ist, andere Substrate als Acetylpolyamine umzusetzen und sich im weiteren Verlauf der Evolution weiter auf diese spezialisiert.

Neben einer Genduplikation kommt insbesondere bei Bakterien auch ein horizontaler Gentransfer in Frage¹³⁵. Dieser kann innerhalb verschiedener *Pseudomonas* Spezies oder mit anderen Bakterienarten stattfinden. Besonders Biofilme bilden beste Bedingungen für diese Art von Gentransfer¹³⁶.

5.3. Rückschlüsse auf den Mechanismus anhand von Mutationsstudien an PA3774

Wie in der Einleitung unter 1.1.4 bereits dargelegt, werden in der Literatur derzeit zwei unterschiedliche Mechanismen für die Deacetylierung diskutiert. Der Unterschied zwischen beiden besteht hauptsächlich in der genauen Funktion der beiden konservierten Histidine. Im zuerst von Finnin *et al.* postuliertem klassischen „Säure-Base-Paar“-Mechanismus fungiert das innere Histidin (H143 in PA3774) als Base, während das Äußere (H144) die Funktion einer Säure übernimmt¹⁷. Von Corminboeuf *et al.* wurde hingegen ein „proton-shuttle“-Mechanismus vorgeschlagen, bei dem das äußere Histidin (H144) als Base und Säure fungiert, während das innere Histidin (H143) als elektrostatischer Katalysator hilft, das angreifende Wasser zu aktivieren¹⁸. Das ebenfalls für die katalytische Aktivität wichtige Tyrosin (Y313), hat in beiden Mechanismen die Aufgabe den tetraedrischen Übergangszustand zu stabilisieren. In beiden vorgestellten Mechanismen wurden quantenmechanische Berechnungen angestellt, um die günstigsten energetischen Übergangszustände zu kalkulieren, um daraus den exakten Reaktionsmechanismus abzuleiten. In die Berechnungen flossen intramolekulare Atomabstände zwischen Enzym und Liganden ein, die aus den Röntgenstrukturanalysen von HDAC8 und HDLP gewonnen wurden. Trotz nahezu identischer Ausgangssituation kamen die verschiedenen Gruppen entweder zum zuerst postulierten „Säure-Base-Mechanismus“^{17, 21} oder zum später postuliertem „proton-shuttle“-Mechanismus^{18, 20}, wobei beide Lager für sich in Anspruch nehmen, dass ihre Daten im Einklang mit den Aktivitäten aus den Mutationsstudien stehen.

Die beiden vorgeschlagenen Mechanismen unterscheiden sich darüber hinaus noch im Protonierungsgrad der beiden Histidine zu Beginn der Reaktion. Auch innerhalb des „proton-shuttle“-Mechanismus, gibt es verschiedene Annahmen hinsichtlich des Protonierungsgrades der beiden Histidine. Während Corminboeuf *et al.*¹⁸ und Wu *et al.*¹⁹ von neutralen Histidinen zum Reaktionsbeginn ausgehen, gehen Gantt *et al.*²⁰ davon aus, dass das innere Histidin protoniert vorliegt. Eine exakte Determinierung des Protonierungsgrad könnte somit Aufschluss über dem Mechanismus liefern. Jedoch kann im Zuge einer Röntgenstrukturanalyse der genaue Protonierungsgrad zumindest von Histidinen nicht mit der notwendigen Genauigkeit bestimmt werden¹³⁷.

Für die postulierten Mechanismen, wurden neben QM/MM-Kalkulationen, zusätzlich auf Basis von Mutationsstudien an HDAC8 und HDLP argumentiert. In beiden Enzymen wurde beobachtet, dass eine Mutation des äußeren Histidins die Aktivität stärker beeinträchtigt als eine Mutation des inneren Histidins. Im Vergleich dazu wurde aber bei den korrespondierenden PA3774-Mutanten, keinerlei Umsatz mehr innerhalb der Messgrenzen detektiert. Somit erscheinen hier beide Histidine gleichermaßen essenziell, zumindest was die Umsatzrate gegenüber dem acetylierten Substrat angeht. Mit dem chemisch aktivierten trifluoracetylierten Substrat konnte noch eine Restaktivität detektiert werden. Im Gegensatz zu HDAC8 und HDLP, war der Effekt der Histidine bei PA3774 allerdings invertiert. So hatte eine Mutation des äußeren Histidins (H144A) einen größeren Aktivitätsverlust zur Folge, als eine Mutation des inneren Histidins, wenn auch nur gering. In einer kürzlich publizierten Studie zu HDAC6 fand sich ebenfalls diese Beziehung¹³⁸.

Dabei muss außerdem bedacht werden, dass es sich bei HDAC8 und HDLP um HDACs der Klasse I handelt, während PA3774 und HDAC6 der Klasse IIb zugeordnet werden. Die beiden Klassen unterscheiden sich im Aufbau ihres äußeren „charge-transfer-relay-systems“. In der Klasse I findet sich ein streng konserviertes His-Asp-Paar, während sich in der Klasse IIb ein konserviertes His-Asn-Paar findet. Durch diese strukturellen Unterschiede sowie den gemessenen Abweichungen in den Restaktivitäten besteht die Möglichkeit, dass sich der Mechanismus zwischen den spezifischen HDAC-Klassen unterscheidet.

Aus den in dieser Arbeit determinierten Strukturen, in Kombination mit den ermittelten Restaktivitäten der Mutanten (vgl. 4.1.3), auf den exakten Mechanismus zurückzuschließen, gestaltet sich als schwierig. An dieser Stelle wäre es daher nötig mit den neu gewonnen enzymologischen und strukturellen Ergebnissen weiterführende QM/MM sowie MD-Simulationen für die Klasse IIb durchzuführen. Die erhaltenen Strukturen von PA3774 und FB188-HDAH mit dem Inhibitor SATFMK als Ligand, wären hierbei ein solider Grundstein, da sie bereits den tetraedrischen Übergangszustand während der Reaktion imitieren. Hilfreich wäre es weiterführend ein acetyliertes-Lysin-Substrat an eine inaktive Mutante zu binden und davon die Struktur zu bestimmen. Dies könnte solide Daten über den Anfangszustand der Reaktion liefern.

Neben den beiden Histidinen wurde auch der Einfluss des Tyrosins (Y313) untersucht. Dazu wurde dieses durch ein katalytisch nicht aktives Phenylalanin ersetzt. Da HDAC-Enzyme der Klasse IIa an der Stelle des Tyrosins ein Histidin aufweisen, wurde zusätzlich auch eine Histidin-Mutante erzeugt.

Gegenüber dem acetylierten Substrat zeigte keine der beiden Mutanten eine Aktivität. Gegenüber dem chemisch aktivierten trifluoracetylierten Substrat zeigten allerdings beide Mutanten so gut wie keinen (PA3774_{Y313F}) bzw. wenig Aktivitätsverlust (PA3774_{Y313H}). Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass die chemische Aktivierung durch den negativen –I-Effekt der Fluoratome groß genug ist, um den katalytischen Verlust des Tyrosins nahezu vollständig auszugleichen.

Von HDAC4 (Klasse IIa) ist in diesem Zusammenhang bekannt, dass lediglich das chemisch aktivierte trifluoracetylierte Substrat signifikant umgesetzt wird¹⁵. Bei diesem Enzym führt eine Mutation des Histidin zu Tyrosin zwar dazu, dass auch das acetylierte Substrat umgesetzt wird, allerdings bei gleichzeitiger Minderung der Aktivität gegenüber dem trifluoracetylierten Substrat¹⁵. Dieser Befund wird auf eine sterische Hinderung des Tyrosins gegenüber der voluminösen Trifluoracetylgruppe zurückgeführt¹⁵. Bei PA3774 sollten daher im Umkehrschluss die Y313-Mutanten aktiver gegenüber dem trifluoracetylierten Substrat sein als das Wildtyp-Enzym. Dies wurde allerdings nicht beobachtet, was bei kommensurabler Argumentation bedeuten würde, dass dieses Substrat in der Bindetasche keine sterische Hinderung durch das Tyrosin erfährt. Dies steht im Einklang mit den gelösten Strukturen der PA3774_{Y313F}-Mutanten, bei denen das korrespondierende Phenylalanin eine „auswärts“-Konformation weg vom Aktivzentrum einnehmen kann und somit keine sterische Hinderung hervorrufen würde.

Ein interessanter Befund ergibt sich aus dem Vergleich zwischen PA3774 und FB188-HDAH. Bei beiden Enzymen ist die innere Bindetasche nahezu identisch aufgebaut. Trotzdem zeigt PA3774 eine deutlich höhere Umsatzrate gegenüber dem trifluoracetylierten Substrat, während es sich bei FB188-HDAH umgekehrt verhält. Bei ausschließlicher Betrachtung der Struktur würde dieses Verhalten nicht vorhergesagt werden. Dieser Befund gibt Rätsel auf und über mögliche Gründe könnte an dieser Stelle nur spekuliert werden. Vielmehr soll dieses Beispiel illustrieren wie schwierig und irreführend es sein kann, von einem Enzym detaillierte Rückschlüsse für andere Proteine zu ziehen, seien sie auch noch so ähnlich.

5.4. Beurteilung der photoschaltbaren Inhibitoren

In Kooperation mit dem Imperial College London wurde die Effizienz photoschaltbarer Inhibitoren auf die menschlichen und bakteriellen HDAC-Enzyme untersucht¹¹⁵. In Anbetracht der bereits in der Einleitung dargelegten Bedeutung von HDAC-Inhibitoren in der Krebsforschung, sowie dem Resultat, dass *Pseudomonas aeruginosa* nur unter Ausnahmenbedingungen von HDAC-Inhibitoren nachhaltig negativ beeinflusst wird, sind die erhaltenen Ergebnisse bezüglich der humanen Enzyme sicherlich als relevanter einzustufen. Die bakteriellen HDACs, eignen sich dennoch hervorragend als Modellenzyme, da sie vergleichbare Ergebnisse liefern, aber einen deutlichen Vorteil in Bezug auf Handhabung und vor allem Kosten besitzen.

Für eine Therapie geeignete photoschaltbare Inhibitoren sollten mehrere Anforderungen erfüllen:

1. Die Verweilzeiten der Substanzen im metastabilen *cis*-Zustand sollten mindestens wenige Stunden betragen.
2. Das Gleichgewicht im photostationären Zustand sollte möglichst weit auf Seite der *cis*-Konfiguration liegen.
3. Der Differenz im Inhibitionsverhalten zwischen den beiden Konfigurationen sollte so groß wie möglich sein, mindesten aber den Faktor 3 betragen.
4. Die Inhibitoren sollten gut verträglich, wenig Nebenwirkungen und möglichst selektiv sein.

Bedingungen 1 und 2 wurden bereits im Vorfeld vom Kooperationspartner am Imperial College validiert und veröffentlicht⁶². Unsere Untersuchungen beschränkten sich auf die 3. Bedingung. Die wichtigste Erkenntnis aus den Versuchen ist, dass eine Photoschaltung dieser Inhibitoren möglich ist und ein unterschiedliches Inhibitionsverhalten in Abhängigkeit der Konfiguration festgestellt werden kann. Die signifikantesten Unterschiede zwischen der *cis*- und *trans*-Konfiguration zeigen HDAC1 und HDAC2 sowie die bakterielle PA1409. Bei allen drei genannten Enzymen besitzt interessanterweise die *cis*-Konfiguration eine deutlich höhere inhibitorische Wirkung. Diese Beziehung wurde quasi zeitgleich von der Arbeitsgruppe um Ben Feringa gefunden, die sich ebenfalls mit photoschaltbaren HDAC-Inhibitoren auf Azobenzolbasis beschäftigte⁵². Eine stärkere Inhibition der *cis*-Isomere entsprach nicht unbedingt der Erwartung, da im Vorfeld davon ausgegangen wurde, dass die *cis*-Konfiguration mehr sterische Hinderungen in den engen Bindungstaschen aufweisen sollte. Wie sich herausstellte, war diese Vorstellung allerdings zu vereinfacht.

.

Der Befund, dass die *cis*-Konfiguration eine stärkere Inhibition zeigt, ist allerdings ein unverhoffter Vorteil, wodurch eine mögliche Therapie deutlich vereinfacht wird. So könnte die thermodynamisch stabilere *trans*-Konfiguration als Medikament oral eingenommen werden und anschließend durch direkte Bestrahlung am Tumor in die aktivere *cis*-Konfiguration überführt werden. Umkehrt hätte der Inhibitor vor der Einnahme bestrahlt werden müssen, um anschließend durch lokale Bestrahlung des Tumors die aktivere *trans*-Konfiguration herzustellen. Da aber durch thermische Relaxation ein Großteil des Medikamentes von selbst in den *trans*-Zustand relaxieren würde, wäre diese Variante weniger effektiv und hätte deutlich mehr Nebenwirkungen, da sich auch im gesunden Gewebe die aktivere Konfiguration irgendwann vorfände.

Die grundlegende Realisierbarkeit zur Entwicklung photoschaltbarer Inhibitoren wurde durch die Experimente klar aufgezeigt. Die Kombination aus Hydroxamsäuren zur Chelatierung des katalytischen Zinkions und Azobenzolen oder Arylazopyrazolen als photoschaltbare Elemente erwies sich ebenfalls als vielversprechend. Der nachweisliche Unterschied zwischen beiden Konfigurationen und insbesondere das stärkere Inhibitionsverhalten der *cis*-Konfiguration bilden eine solide Grundlage für weiterführende Experimente. Im Detail gibt es allerdings noch Verbesserungsbedarf. So wäre eine Möglichkeit, durch ausgefeiltere Substitutionsmuster an den Arylringen, die Differenzen zwischen den beiden Zuständen weiter zu vergrößern. Darüber hinaus könnte dadurch auch eine Selektivität gegenüber bestimmten HDAC-Isoformen herbeigeführt werden. Durch das Einfügen elektronenschiebender oder elektronenziehender Gruppen am Aromaten könnte die Quantenausbeute des *cis*-Isomeres oder die Verweildauer im metastabilen Zustand angepasst werden. Wegen der natürlichen Diffusion sollte allerdings auch das *cis*-Isomer nicht zu lange stabil sein, um umliegendes Gewebe nicht zu beschädigen. Durch polare Gruppen könnte auch auf die Löslichkeit des Chemotherapeutikums Einfluss genommen werden. In einer späteren klinischen Testphase müssten selbstverständlich noch weitere Aspekte, wie Nebenwirkungen, die biologische Halbwertszeit oder die Toxizität entstehender Metaboliten berücksichtigt werden.

Zusätzlich ließ sich durch die Experimente zeigen, dass die Stilben-Derivate nahezu identische Ergebnisse wie ihre korrespondierenden Azoverbindungen liefern. Dies ist insbesondere im Hinblick auf Hochdurchsatz-Screening-Methoden interessant, da bei diesen Substanzen keine Relaxation in den thermodynamisch stabileren Zustand stattfindet und so das zeitaufwendige Bestrahlen vor jeder Messung entfiel. Dies wäre eine Grundvoraussetzung, da das Bestrahlen von einzelnen Kavitäten auf einer 96- oder 384-Mikrotiterplatte ohnehin experimentell schwieriger zu bewerkstelligen wäre und somit ungeeignet für schnelle Hochdurchsatz-Screening-Verfahren.

5.5. Beurteilung des Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays

Die in der Einleitung unter 1.5 aufgezählten Anforderungen an einen adäquaten Assay wurden allesamt erfüllt. Die DBD-Sonde besitzt alle gewünschten Eigenschaften. So zeigt die Fluoreszenzlebensdauer ($\Delta\tau$) eine außerordentlich hohe Abhängigkeit von ihrer Umgebung. Der Unterschied, bei Bindung der Sonde zum Enzym, beträgt im Vergleich zur freien Lösung bis zu 7,2 ns, was einer Verlängerung der Lebensdauer um den Faktor 3,5 entspricht. Da typische autofluoreszierende Substanzen meist im Bereich von 2 ns liegen, ist eine spektrale Unterscheidung zwischen Mess- und Störsignal somit problemlos möglich. Des Weiteren beträgt der Unterschied zwischen Anregungs- und Emissionswellenlänge (Stokes-Verschiebung) 177 nm (Ex. 457 nm, Em. 634 nm), was einer vergleichsweise großen Differenz entspricht¹⁰³. Durch diese große Stokes-Verschiebung wird die ungewünschte Eigenfluoreszenzlöschung nahezu ausgeschlossen. Darüber hinaus liegen beide Wellenlängen im langwelligen Bereich, womit eine bessere Unterscheidung von fluoreszierenden Verunreinigungen gewährleistet ist, die üblicherweise im kürzer welligen Spektrum liegen⁸⁷. Dass diese beiden essenziellen Eigenschaften (hohe $\Delta\tau$ und große Stokes-Verschiebung) gemeinsam auftreten ist eher selten und ein Hauptgrund dafür, warum diese Art des Fluoreszenz-Assays vergleichsweise weniger praktische Anwendung findet⁸⁷. Eine weitere Anforderung aus Abschnitt 1.5 ist, dass die Sonde eine mittlere Affinität zu den Enzymen aufweist, damit diese auch von weniger potenten Inhibitoren verdrängt werden kann. Wie die Ergebnisse aus 4.5 zeigen, ist auch diese Eigenschaft für alle getesteten Enzyme erfüllt.

Neben den grundlegenden physikalischen Anforderungen müssen bei Hochdurchsatz-Screening-Methoden weitere spezielle Voraussetzungen erfüllt sein. Dazu zählen beispielsweise: einfache Handhabung, Robustheit, Möglichkeit der Miniaturisierung und Parallelisierung, schnelle Durchführung sowie Kosteneffizienz durch möglichst geringen Einsatz der zu verwendenden Substanzen und Enzyme. Der entwickelte Assay erfüllt all diese Kriterien. Er lässt sich in einem Zweischrittverfahren durchführen. Im ersten Schritt wird einmalig eine Enzym-Sonden-Komplex-Stammlösung hergestellt. Diese wird im zweiten Schritt zu testenden Mikrotiterplatten der Substanzbibliothek pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubationsphase können die Ergebnisse gemessen werden. Da die eigentliche Messung allerdings nur maximal fünf Minuten in Anspruch nimmt, können während der Inkubationsphase bereits viele weitere Platten vorbereitet werden. In Verbindung mit einer 96- oder gar 384-Mikrotiterplatte, können so viele potenzielle Inhibitoren innerhalb kürzester Zeit getestet werden. Dies ist selbstverständlich nur möglich, wenn die eingesetzten Enzyme und Sonden eine hohe chemische Stabilität über einen längeren Zeitraum aufweisen. Auch diese Eigenschaft wurde entsprechend untersucht, indem eine fertig inkubierte Mikrotiterplatte über einen Zeitraum von 30 h in regelmäßigen Abständen gemessen wurde. Dabei

wich die letzte Messung nur minimal von der Ersten ab. Der Z'-Faktor (Maß der statistischen Effektgröße), war dabei $\geq 0,78$), was die außerordentlich hohe Robustheit dieses Assay bestätigt⁸⁷. Des Weiteren kann die zu verwendende Fluoreszenzsonde in einer geringen Konzentration von 50 nM eingesetzt werden und die Proteine lassen sich einfach rekombinant herstellen. Eine kostengünstige Durchführung des Assays ist somit gewährleistet.

Doch auch die besten Vorraussetzungen sind wertlos, wenn der Assay nicht in der Lage ist potenzielle Inhibitoren zu erkennen. Um dies zu evaluieren wurden Versuche mit bekannten Inhibitoren durchgeführt. Wie unter 4.5 dargelegt, war der Assay nicht nur in der Lage alle Inhibitoren als solche zu erkennen, sondern auch die ermittelten Bindungskonstanten waren mit den Ergebnissen des unabhängigen AMC-Assays vergleichbar. Allerdings gab es auch vereinzelte Abweichungen, wie beispielsweise bei PA1409 oder PA3774 in Verbindung mit dem Inhibitor MB265. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten nicht kovalente Interaktionen zwischen Inhibitor und der DBD-Sonde sein. Vergleichbare Artefakte wurden auch in anderen Untersuchungen gefunden¹³⁹.

Das Hauptproblem bei Hochdurchsatz-Screening-Verfahren ist das Auftreten von Falsch-positiv-Resultaten. Durch das große Zeitfenster der FLT, besitzt der Assay auch in diesem Zusammenhang vielversprechende Eigenschaften. Beim Enzym PA1409 entspricht eine FLT von 7,1 ns beispielsweise einem Bindungsgrad von 90 %. Würden alle Substanzen, die unter 6,5 ns liegen, als „Hit“ definiert, so wäre die Falsch-positiv-Rate bei lediglich 0,01 %, was weniger als 100 falscher „Hits“ pro 1 Mio. getesteter Substanzen entspräche. Dies ist ein sehr guter Wert⁶³.

6. FAZIT

Die vorliegende Arbeit war Teil eines DFG-Projektes, welches die Fragestellung untersuchte, ob eine Inhibition der drei putativen Acetylpolyamin-Amidohydrolasen (APAHs) des Humanpathogens *Pseudomonas aeruginosa* sich negativ auf dessen Wachstum oder dessen Biofilmbildung auswirkt. Ausgehend von dieser Fragestellung und den in Abschnitt 1.7 formulierten Zielsetzungen werden im Folgenden die wichtigsten Erkenntnisse und deren Bedeutung zusammengefasst.

Zu Beginn wurde ein geeignetes Reinigungsprotokoll entwickelt, um die drei Enzyme PA0321, PA1409 und PA3774 rekombinant in *E. Coli* zu produzieren. Die anschließende Charakterisierung ergab, dass es sich bei den beiden Enzymen PA0321 und PA1409 um tatsächliche APAHs handelt. Im Gegensatz dazu war das Enzym PA3774 nicht in der Lage acetylierte Polyamine zu metabolisieren, zeigte aber einen hohen Umsatz von artifiziellen HDAC-Substraten. Dies führte zur Vermutung, dass noch nicht identifizierte acetylierte Proteine die eigentlichen Substrate dieses Enzyms sind. Die *in vitro* Resultate standen im Einklang mit den erhobenen Experimenten *in vivo*. Es konnte nachgewiesen werden, dass *Pseudomonas aeruginosa* durch die beiden APAHs in der Lage ist, ausschließlich mit acetylierten Polyaminen als Nahrungsquelle zu gedeihen. Waren die beiden Enzyme durch einen Gen-Knock-out oder durch Zugabe von APAH-Inhibitoren deaktiviert, kam das Wachstum zum Erliegen. Leider zeigte *P. aeruginosa*, solange andere Nahrungsquellen wie Glukose verfügbar waren, kein verringertes Wachstum und die Biofilmbildung wurde durch die Zugabe von APAH-Inhibitoren gesteigert. Mit diesem Resultat war die grundlegende Fragestellung frühzeitig geklärt und die Frage ob APAHs gute Angriffsziele sind, um bakterielle Infektionen zu bekämpfen, muss zumindest in diesem Zusammenhang mit „Nein“ beantwortet werden. Dies ist insbesondere vor dem Hintergrund bedauerlich, da mit dem perfluorierten SAHA-Derivat PFSAHA ein potenter und selektiver Inhibitor gefunden wurde. Generell scheint die Fluorierung von Inhibitoren ein vielversprechender Ansatz zu sein, um eine Selektivität gegenüber bakteriellen HDAC-Enzymen zu erzeugen.

Unabhängig des anwendungsorientierten Ansatzes, zur Bekämpfung dieses Pathogens, besitzt die Erforschung bakterieller Histon-Deacetylase-ähnlicher Enzyme eine grundlegende Relevanz, da sie solide Modellenzyme darstellen, aber sich im Vergleich zu ihren eukaryotischen Vertretern einfacher handhaben lassen. Durch die hohe Homologie können allgemeine Prinzipien wie Bindemechanismen oder Erkenntnisse über den strukturellen Aufbau übertragen werden und führen zu einem besseren Verständnis der gesamten Proteinfamilie.

Das Hauptaugenmerk der Arbeit lag auf der strukturellen Aufklärung dieser Enzyme mithilfe der Röntgenstrukturanalyse. Dabei gelang es die Struktur des Enzyms PA3774 in seiner nativen Form, wie im Komplex mit verschiedenen Inhibitoren, bei hohen Auflösungen aufzuklären. Das Enzym zeigt eine hohe Ähnlichkeit mit der bekannten Histon-Deacetylase-ähnliche Amidohydrolase (HDAH) FB188 aus *Bordetella/Alcaligenes* und sollte deshalb ebenfalls als „HDAH“ klassifiziert werden. Beide HDAHs formen ein Tetramer, welches im Kristall wie in freier Lösung nachgewiesen werden konnte. Hauptverantwortlich für diese unikale Quartärstruktur ist ein deutlich verlängerter L1-Loop, der sonst bei keinem anderen Enzym dieser Klasse zu finden ist. Die spezifische Assemblierung beeinflusst zudem die Substratbindung bzw. Selektivität, da durch die Interaktionen der Untereinheiten der Zugang zum Aktivzentrum entscheidend verändert wird. Trotz der hohen strukturellen Homologie der beiden Enzyme zeigen beide teilweise ein unterschiedliches Verhalten in Bezug auf Substrat- und Inhibitorselektivität. Um diesen Sachverhalt detaillierter zu untersuchen, wurde das Enzym FB188-HDAH im Rahmen dieser Arbeit erneut kristallisiert und auch hier konnten bisher nicht beschriebene Enzym-Inhibitor-Komplexe determiniert werden. Der Vergleich analoger Enzyme-Inhibitor-Komplexe beider Enzyme zeigt dabei kleine Unterschiede in der Ligandenbindung, die eine plausible Erklärung für die unterschiedlichen Affinitäten liefern. Ferner lassen Untersuchungen an beiden Enzymen den Schluss zu, dass der L2-Loop am Eingang der Bindetasche die flexibelste Region dieser Proteine ist und ein entscheidender Faktor für die Substratbindung darstellt. Beim Enzym FB188-HDAH kann zwischen einer „geschlossenen“ und „offenen“ Konformation dieses Loops unterschieden werden, während bei PA3774 ausschließlich die offene Konformation existiert, unabhängig davon, ob ein großer oder kleiner Ligand gebunden ist.

Die Strukturaufklärung der beiden APAHs PA0321 und PA1409 führte im Verlaufe der Arbeit nicht zum Erfolg. Allerdings ist die Struktur der eng verwandten APAH aus *M. ramosa* bekannt, die einen Vergleich zulässt. Insbesondere der Befund, dass alle untersuchten APAHs einen deutlich verlängerten L2-Loop aufweisen, ist hierbei von Bedeutung. Analog dem verlängerten L1-Loop bei den HDAHs, führt der verlängerte L2-Loop bei der APAH aus *M. ramosa* zu einer Dimerisierung, die in dieser Form bei keinem anderen Enzym innerhalb dieser Enzymfamilie beobachtet wird. Ähnlich den HDAHs wird hierdurch der Zugang zur Bindetasche partiell von einer Seite abgeschirmt.

Zusammenfassend tragen die determinierten Strukturen, in Verbindung mit den ermittelten Substratspezifitäten, maßgeblich zu einem besseren Verständnis der HDAC-Superfamilie bei. Insbesondere vor dem Hintergrund, dass die katalytischen Domänen dieser Enzyme sehr ähnlich sind, kommt den intrinsischen Loop-Verlängerungen oder den verlängerten N- und C-Termini eine entscheidende Bedeutung zu. Wie die erhobenen Ergebnisse verdeutlichen, ist ein vollständiges Verständnis der Substratselektivität dieser Enzyme nur möglich, wenn Kenntnisse über deren

Quartärstruktur bzw. deren Assoziation in Multienzymkomplexen vorhanden sind. Dies spielt insbesondere beim molekularen Docking eine zentrale Rolle. Hier werden teilweise lediglich die monomeren Strukturen berücksichtigt, was zu unzureichenden Ergebnissen führen kann. Folglich müssen neben dem Aufbau des Aktivzentrums die Interaktionen der Untereinheiten, bei der Entwicklung selektiver und potenter Inhibitoren, berücksichtigt werden. Zwar kommen moderne *in silico* Verfahren zur Vorhersage der Tertiärstruktur nahe an die Realität heran, sofern ähnliche Strukturen bekannt sind, jedoch gilt dies nicht für die Vorhersage der Quartärstruktur. Vor diesem Hintergrund nehmen experimentelle Methoden zur Strukturaufklärung nach wie vor eine essenzielle Rolle ein.

Im Rahmen der Arbeit wurde zusätzlich an zwei Nebenprojekten gearbeitet. Im Ersten wurde ein für diese Enzymfamilie neuartiger Fluoreszenzlebensdauer-Bindungs-Assays (FLT) entwickelt, der sich zum Hochdurchsatz-Screening von Substanzbibliotheken eignet. Dabei wurden die günstigen Eigenschaften der eingesetzten DBD-Sonde bezüglich Stokes-Verschiebung, Fluoreszenzlebensdauer und Sensitivität gegenüber Polaritätsveränderungen ausgenutzt. Der entwickelte Assay ist äußerst robust, einfach in der Handhabung und sensibel. Darüber hinaus zeigen die daraus ermittelten Bindungskonstanten eine exzellente Korrelation mit orthogonal erhobenen Daten. Damit steht der Findung von Inhibitoren für die pharmakologisch höchst bedeutsamen menschlichen HDACs ein weiteres Werkzeug zur Verfügung.

Im zweiten Nebenprojekt wurden photoschaltbare Inhibitoren für die HDAC-Familie getestet. Die erhaltenen Resultate und insbesondere der Befund, dass das metastabile *cis*-Isomer eine um bis zu 10-fach höhere Potenz als das *trans*-Isomer aufwies, sind äußerst vielversprechend. Damit wurde ein wichtiger Grundstein für die prinzipielle Realisierbarkeit einer nebenwirkungsärmeren photodynamischen Chemotherapie gelegt, wenngleich es bis zu klinischen Testphasen noch ein weiter Weg ist.

Im Großen und Ganzen lässt sich feststellen, dass die gesteckten Ziele weitestgehend erreicht wurden und die grundlegende Hypothese des DFG-Projekts klar, wenn auch negativ, beantwortet werden konnte. Die Ergebnisse wurden in sechs Publikationen dokumentiert.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Leipe, D. D., and Landsman, D. (1997) Histone deacetylases, acetoin utilization proteins and acetylpolymine amidohydrolases are members of an ancient protein superfamily, *Nucleic acids research* 25, 3693-3697.
- [2] Gregoret, I. V., Lee, Y. M., and Goodson, H. V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis, *Journal of molecular biology* 338, 17-31.
- [3] Brehm, A., Miska, E. A., McCance, D. J., Reid, J. L., Bannister, A. J., and Kouzarides, T. (1998) Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription, *Nature* 391, 597-601.
- [4] Haberland, M., Montgomery, R. L., and Olson, E. N. (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy, *Nat Rev Genet* 10, 32-42.
- [5] Mack, G. S. (2010) To selectivity and beyond, *Nat Biotech* 28, 1259-1266.
- [6] Wood, T. E., Dalili, S., Simpson, C. D., Sukhai, M. A., Hurren, R., Anyiwe, K., Mao, X., Saiz, F. S., Gronda, M., and Eberhard, Y. (2010) Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands, *Molecular cancer therapeutics* 9, 246-256.
- [7] Bolden, J., Shi, W., Jankowski, K., Kan, C., Cluse, L., Martin, B., MacKenzie, K., Smyth, G., and Johnstone, R. (2013) HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses, *Cell death & disease* 4, e519.
- [8] Takimoto, R., Kato, J., Terui, T., Takada, K., Kuroiwa, G., Wu, J., Ohnuma, H., Takahara, D., Kobune, M., and Sato, Y. (2005) Augmentation of antitumor effects of p53 gene therapy by combination with HDAC inhibitor, *Cancer biology & therapy* 4, 427-434.
- [9] Condorelli, F., Gnemmi, I., Vallario, A., Genazzani, A., and Canonico, P. (2008) Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells, *British journal of pharmacology* 153, 657-668.
- [10] Harp, J. M., Hanson, B. L., Timm, D. E., and Bunick, G. J. (2000) Asymmetries in the nucleosome core particle at 2.5 Å resolution, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 56, 1513-1534.
- [11] Mahla, R. S. (2012) Comment on: Winkler et al. Histone Deacetylase 6 (HDAC6) Is an Essential Modifier of Glucocorticoid-Induced Hepatic Gluconeogenesis. *Diabetes* 2012;61:513-523, *Diabetes* 61, e10.
- [12] Haggarty, S. J., Koeller, K. M., Wong, J. C., Grozinger, C. M., and Schreiber, S. L. (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 4389-4394.
- [13] Grundy, F. J., Waters, D. A., Takova, T. Y., and Henkin, T. M. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *Bacillus subtilis*, *Molecular microbiology* 10, 259-271.
- [14] Lopez, J., and Fortinagel, P. (1972) The regulation of the butanediol cycle in *Bacillus subtilis*, *Biochim Biophys Acta* 279, 554-560.
- [15] Bottomley, M. J., Lo Surdo, P., Di Giovine, P., Cirillo, A., Scarpelli, R., Ferrigno, F., Jones, P., Neddermann, P., De Francesco, R., Steinkuhler, C., Gallinari, P., and Carfi, A. (2008) Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain, *The Journal of biological chemistry* 283, 26694-26704.
- [16] Schuetz, A., Min, J., Allali-Hassani, A., Schapira, M., Shuen, M., Loppnau, P., Mazitschek, R., Kwiatkowski, N. P., Lewis, T. A., Maglathin, R. L., McLean, T. H., Bochkarev, A., Plotnikov, A. N., Vedadi, M., and Arrowsmith, C. H. (2008) Human HDAC7 harbors a class IIa histone deacetylase-specific zinc binding motif and cryptic deacetylase activity, *The Journal of biological chemistry* 283, 11355-11363.

-
-
- [17] Finnin, M. S., Donigian, J. R., Cohen, A., Richon, V. M., Rifkind, R. A., Marks, P. A., Breslow, R., and Pavletich, N. P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors, *Nature* 401, 188-193.
- [18] Corminboeuf, C., Hu, P., Tuckerman, M. E., and Zhang, Y. (2006) Unexpected deacetylation mechanism suggested by a density functional theory QM/MM study of histone-deacetylase-like protein, *Journal of the American Chemical Society* 128, 4530-4531.
- [19] Wu, R., Wang, S., Zhou, N., Cao, Z., and Zhang, Y. (2010) A proton-shuttle reaction mechanism for histone deacetylase 8 and the catalytic role of metal ions, *Journal of the American Chemical Society* 132, 9471-9479.
- [20] Gantt, S. M. F., Decroos, C., Lee, M. S., Gullett, L. E., Bowman, C. M., Christianson, D. W., and Fierke, C. A. (2016) General Base-General Acid Catalysis in Human Histone Deacetylase 8, *Biochemistry* 55, 820-832.
- [21] Chen, K., Zhang, X., Wu, Y. D., and Wiest, O. (2014) Inhibition and mechanism of HDAC8 revisited, *Journal of the American Chemical Society* 136, 11636-11643.
- [22] Canellakis, Z., Marsh, L., and Bondy, P. (1989) Polyamines and their derivatives as modulators in growth and differentiation, *Yale J. Biol. Med* 62, 481.
- [23] Falbe, J., Römpp, H., and Regitz, M. (1990) *Römpp Chemie Lexikon*, Vol. 3, Thieme.
- [24] Tabor, C. W., and Tabor, H. (1976) 1,4-Diaminobutane (putrescine), spermidine, and spermine, *Annu Rev Biochem* 45, 285-306.
- [25] Wang, C., Delcros, J.-G., Cannon, L., Konate, F., Carias, H., Biggerstaff, J., Gardner, R. A., and Phanstiel. (2003) Defining the Molecular Requirements for the Selective Delivery of Polyamine Conjugates into Cells Containing Active Polyamine Transporters, *Journal of medicinal chemistry* 46, 5129-5138.
- [26] Smirnova, O. A., Isaguliants, M. G., Hyvonen, M. T., Keinanen, T. A., Tunitskaya, V. L., Vepsäläinen, J., Alhonen, L., Kochetkov, S. N., and Ivanov, A. V. (2012) Chemically induced oxidative stress increases polyamine levels by activating the transcription of ornithine decarboxylase and spermidine/spermine-N1-acetyltransferase in human hepatoma HUH7 cells, *Biochimie* 94, 1876-1883.
- [27] Patel, C., Wortham, B., Lines, J., Fetherston, J., Perry, R., and Oliveira, M. (2006) Polyamines are essential for the formation of plague biofilm, *Journal of bacteriology* 188, 2355 - 2363.
- [28] Wortham, B., Oliveira, M., Fetherston, J., and Perry, R. (2010) Polyamines are required for the expression of key Hms proteins important for yersinia pestis biofilm formation, *Environ Microbiol* 12, 2034 - 2047.
- [29] Williams, B., Du, R.-H., Calcutt, M., Abdolrasulnia, R., Christman, B., and Blackwell, T. (2010) Discovery of an operon that participates in agmatine metabolism and regulates biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa*, *Molecular microbiology* 76, 104 - 119.
- [30] Kwon, D. H., and Lu, C. D. (2007) Polyamine effects on antibiotic susceptibility in bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 2070-2077.
- [31] Kwon, D. H., and Lu, C. D. (2006) Polyamines increase antibiotic susceptibility in *Pseudomonas aeruginosa*, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 1623-1627.
- [32] Kwon, D., and Lu, C.-D. (2006) Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 1615 - 1622.
- [33] Shah, P., and Swiatlo, E. (2008) A multifaceted role for polyamines in bacterial pathogens, *Molecular microbiology* 68, 4-16.
- [34] Fernandez, I., Silva, M., Schuch, R., Walker, W., Siber, A., Maurelli, A., and McCormick, B. (2001) Cadaverine prevents the escape of shigella flexneri from the phagolysosome: a connection between bacterial dissemination and neutrophil transepithelial signaling, *The Journal of infectious diseases* 184, 743 - 753.
- [35] Maurelli, A., Fernandez, R., Bloch, C., Rode, C., and Fasano, A. (1998) "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci* 95, 3943 - 3948.

- [36] Stover, C. K., Pham, X. Q., Erwin, A. L., Mizoguchi, S. D., Warren, P., Hickey, M. J., Brinkman, F. S., Hufnagle, W. O., Kowalik, D. J., Lagrou, M., Garber, R. L., Goltry, L., Tolentino, E., Westbrook-Wadman, S., Yuan, Y., Brody, L. L., Coulter, S. N., Folger, K. R., Kas, A., Larbig, K., Lim, R., Smith, K., Spencer, D., Wong, G. K., Wu, Z., Paulsen, I. T., Reizer, J., Saier, M. H., Hancock, R. E., Lory, S., and Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen, *Nature* 406, 959-964.
- [37] Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm, *Journal of bacteriology* 184, 1140-1154.
- [38] Gristina, A. G., and Costerton, J. W. (1985) Bacterial adherence to biomaterials and tissue. The significance of its role in clinical sepsis, *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 67, 264-273.
- [39] Kozlova, E. V., Anisimova, L. A., and Boronin, A. M. (1989) [Antibiotic resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from 1979-1984], *Antibiotiki i khimioterapiia = Antibiotics and chemotherapy [sic] / Ministerstvo meditsinskoi i mikrobiologicheskoi promyshlennosti SSSR* 34, 24-28.
- [40] Breidenstein, E. B., de la Fuente-Nunez, C., and Hancock, R. E. (2011) *Pseudomonas aeruginosa*: all roads lead to resistance, *Trends in microbiology* 19, 419-426.
- [41] Lyczak, J. B., Cannon, C. L., and Pier, G. B. (2000) Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist, *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2, 1051-1060.
- [42] Ma, Y., Wang, L., and Shao, Z. (2006) *Pseudomonas*, the dominant polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria isolated from Antarctic soils and the role of large plasmids in horizontal gene transfer, *Environmental Microbiology* 8, 455-465.
- [43] Rowe, S. M., Miller, S., and Sorscher, E. J. (2005) Cystic fibrosis, *The New England journal of medicine* 352, 1992-2001.
- [44] Hassett, D. J., Korfhagen, T. R., Irvin, R. T., Schurr, M. J., Sauer, K., Lau, G. W., Sutton, M. D., Yu, H., and Hoiby, N. (2010) *Pseudomonas aeruginosa* biofilm infections in cystic fibrosis: insights into pathogenic processes and treatment strategies, *Expert opinion on therapeutic targets* 14, 117-130.
- [45] Hoiby, N., Doring, G., and Schiotz, P. O. (1986) The role of immune complexes in the pathogenesis of bacterial infections, *Annu Rev Microbiol* 40, 29-53.
- [46] Kirketerp-Moller, K., Jensen, P. O., Fazli, M., Madsen, K. G., Pedersen, J., Moser, C., Tolker-Nielsen, T., Hoiby, N., Givskov, M., and Bjarnsholt, T. (2008) Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds, *Journal of clinical microbiology* 46, 2717-2722.
- [47] Bjarnsholt, T., Kirketerp-Moller, K., Jensen, P. O., Madsen, K. G., Phipps, R., Krogh, K., Hoiby, N., and Givskov, M. (2008) Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis, *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society* 16, 2-10.
- [48] Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., and Ciofu, O. (2010) Antibiotic resistance of bacterial biofilms, *International journal of antimicrobial agents* 35, 322-332.
- [49] Raymo, F. M., and Tomasulo, M. (2006) Optical processing with photochromic switches, *Chemistry* 12, 3186-3193.
- [50] Becker, H. G., Böttcher, H., Dietz, F., Rehorek, D., Roewer, G., Schiller, K., and Timpe, H. (1983) *Einführung in die Photochemie*, Thieme Stuttgart.
- [51] Malkin, S., and Fischer, E. (1962) TEMPERATURE DEPENDENCE OF PHOTOISOMERIZATION. PART II.1 QUANTUM YIELDS OF *cis* \rightleftharpoons *trans* ISOMERIZATIONS IN AZO-COMPOUNDS, *The Journal of Physical Chemistry* 66, 2482-2486.
- [52] Szymanski, W., Ourailidou, M. E., Velema, W. A., Dekker, F. J., and Feringa, B. L. (2015) Light-Controlled Histone Deacetylase (HDAC) Inhibitors: Towards Photopharmacological Chemotherapy, *Chemistry*.
- [53] Sadovskii, O., Beharry, A. A., Zhang, F., and Woolley, G. A. (2009) Spectral tuning of azobenzene photoswitches for biological applications, *Angew Chem Int Ed Engl* 48, 1484-1486.

- [54] Chi, L., Sadovski, O., and Woolley, G. A. (2006) A blue-green absorbing cross-linker for rapid photoswitching of peptide helix content, *Bioconjugate chemistry* 17, 670-676.
- [55] Zhang, J., James, D. A., and Woolley, G. A. (1999) PATIC: a conformationally constrained photoisomerizable amino acid, *The journal of peptide research : official journal of the American Peptide Society* 53, 560-568.
- [56] Wagner, S., Leyssner, F., Kordel, C., Zarwell, S., Schmidt, R., Weinelt, M., Ruck-Braun, K., Wolf, M., and Tegeder, P. (2009) Reversible photoisomerization of an azobenzene-functionalized self-assembled monolayer probed by sum-frequency generation vibrational spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics* 11, 6242-6248.
- [57] Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., and Fedewa, S. (2012) Cancer treatment and survivorship statistics, 2012, *CA: a cancer journal for clinicians* 62, 220-241.
- [58] Ihbe-Heffinger, A., Paessens, B., Berger, K., Shlaen, M., Bernard, R., von Schilling, C., and Peschel, C. (2013) The impact of chemotherapy-induced side effects on medical care usage and cost in German hospital care—an observational analysis on non-small-cell lung cancer patients, *Supportive Care in Cancer* 21, 1665-1675.
- [59] Yoon, S., and Eom, G. H. (2016) HDAC and HDAC Inhibitor: From Cancer to Cardiovascular Diseases, *Chonnam medical journal* 52, 1-11.
- [60] Thaler, F., and Mercurio, C. (2014) Towards selective inhibition of histone deacetylase isoforms: what has been achieved, where we are and what will be next, *ChemMedChem* 9, 523-526.
- [61] Micelli, C., and Rastelli, G. (2015) Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity, *Drug discovery today* 20, 718-735.
- [62] Weston, C. E., Richardson, R. D., Haycock, P. R., White, A. J., and Fuchter, M. J. (2014) Arylazopyrazoles: azoheteroarene photoswitches offering quantitative isomerization and long thermal half-lives, *Journal of the American Chemical Society* 136, 11878-11881.
- [63] Lakowicz, J. R. (2013) *Principles of fluorescence spectroscopy*, Springer Science & Business Media.
- [64] Massa, W. (2004) *Crystal structure determination*, 2nd completely updated ed., Springer, Berlin ; New York.
- [65] Asherie, N. (2004) Protein crystallization and phase diagrams, *Methods* 34, 266-272.
- [66] Luft, J. R., Albright, D. T., Baird, J. K., and DeTitta, G. T. (1996) The rate of water equilibration in vapor-diffusion crystallizations: Dependence on the distance from the droplet to the reservoir, *Acta Crystallogr D* 52, 1098-1106.
- [67] Fowles, W. W., Delucas, L. J., Twigg, P. J., Howard, S. B., Meehan, E. J., and Baird, J. K. (1988) Experimental and Theoretical-Analysis of the Rate of Solvent Equilibration in the Hanging Drop Method of Protein Crystal-Growth, *J Cryst Growth* 90, 117-129.
- [68] Mikol, V., Rodeau, J. L., and Giege, R. (1990) Experimental-Determination of Water Equilibration Rates in the Hanging Drop Method of Protein Crystallization, *Analytical biochemistry* 186, 332-339.
- [69] Massa, W. (2013) *Crystal structure determination*, Springer Science & Business Media.
- [70] Hoppe, W. (1957) Die Faltmolekulmethode - Eine Neue Methode Zur Bestimmung Der Kristallstruktur Bei Ganz Oder Teilweise Bekannter Molekulstruktur, *Acta Crystallogr* 10, 750-751.
- [71] Rossmann, M. G., and Blow, D. M. (1962) The detection of sub-units within the crystallographic asymmetric unit, *Acta Cryst.* 15, 24-31.
- [72] Kwon, D. H., and Lu, C. D. (2006) Polyamines induce resistance to cationic peptide, aminoglycoside, and quinolone antibiotics in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Antimicrobial agents and chemotherapy* 50, 1615-1622.
- [73] Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D., and Oliveira, M. A. (2006) Polyamines Are Essential for the Formation of Plague Biofilm, *Journal of bacteriology* 188, 2355-2363.
- [74] Chou, H. T., Kwon, D. H., Hegazy, M., and Lu, C. D. (2008) Transcriptome analysis of agmatine and putrescine catabolism in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, *Journal of bacteriology* 190, 1966-1975.

- [75] Riester, D., Wegener, D., Hildmann, C., and Schwienhorst, A. (2004) Members of the histone deacetylase superfamily differ in substrate specificity towards small synthetic substrates, *Biochemical and biophysical research communications* 324, 1116-1123.
- [76] Lottspeich, F., Engels, J. W., and Solodkoff, Z. L. (2012) *Bioanalytik*, Spektrum Akademischer Verlag.
- [77] Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *Gene* 96, 23-28.
- [78] Hochuli, E., Bannwarth, W., Dobeli, H., Gentz, R., and Stuber, D. (1988) Genetic Approach to Facilitate Purification of Recombinant Proteins with a Novel Metal Chelate Adsorbent, *Nat Biotech* 6, 1321-1325.
- [79] Shen, A., Lupardus, P. J., Morell, M., Ponder, E. L., Sadaghiani, A. M., Garcia, K. C., and Bogoy, M. (2009) Simplified, enhanced protein purification using an inducible, autoprocessing enzyme tag, *PloS one* 4, e8119.
- [80] Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., and Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid, *Analytical biochemistry* 150, 76-85.
- [81] Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
- [82] Wegener, D., Hildmann, C., Riester, D., and Schwienhorst, A. (2003) Improved fluorogenic histone deacetylase assay for high-throughput-screening applications, *Analytical biochemistry* 321, 202-208.
- [83] Volund, A. (1978) Application of the four-parameter logistic model to bioassay: comparison with slope ratio and parallel line models, *Biometrics* 34, 357-365.
- [84] Holt, A., and Palcic, M. M. (2006) A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes, *Nat. Protocols* 1, 2498-2505.
- [85] Lombardi, P. M., Angell, H. D., Whittington, D. A., Flynn, E. F., Rajashankar, K. R., and Christianson, D. W. (2011) Structure of prokaryotic polyamine deacetylase reveals evolutionary functional relationships with eukaryotic histone deacetylases, *Biochemistry* 50, 1808-1817.
- [86] Wolfson, N. A., Pitcairn, C. A., Sullivan, E. D., Joseph, C. G., and Fierke, C. A. An enzyme-coupled assay measuring acetate production for profiling histone deacetylase specificity, *Analytical biochemistry*.
- [87] Meyners, C., Wawrzinek, R., Kramer, A., Hinz, S., Wessig, P., and Meyer-Almes, F. J. (2014) A fluorescence lifetime-based binding assay for acetyl polyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa* using a [1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxole (DBD) ligand probe, *Analytical and bioanalytical chemistry* 406, 4889-4897.
- [88] Battye, T. G. G., Kontogiannis, L., Johnson, O., Powell, H. R., and Leslie, A. G. W. (2011) iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLM, *Acta Crystallogr D* 67, 271-281.
- [89] Evans, P. R., and Murshudov, G. N. (2013) How good are my data and what is the resolution?, *Acta Crystallographica Section D* 69, 1204-1214.
- [90] Vagin, A., and Teplyakov, A. (1997) MOLREP: an automated program for molecular replacement, *Journal of applied crystallography* 30, 1022-1025.
- [91] Nielsen, T. K., Hildmann, C., Riester, D., Wegener, D., Schwienhorst, A., and Ficner, R. (2007) Complex structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue with a trifluoromethylketone inhibitor, *Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications* 63, 270-273.
- [92] Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T. (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling, *Bioinformatics* 22, 195-201.
- [93] Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W. G., and Cowtan, K. (2010) Features and development of Coot, *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* 66, 486-501.
- [94] Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method, *Acta Crystallographica D* 53, 240-255.

- [95] Potterton, E., Briggs, P., Turkenburg, M., and Dodson, E. (2003) A graphical user interface to the CCP4 program suite, *Acta Crystallographica Section D* 59, 1131-1137.
- [96] Laskowski, R. A. (2001) PDBsum: summaries and analyses of PDB structures, *Nucleic acids research* 29, 221-222.
- [97] Krissinel, E., and Henrick, K. (2005) Detection of Protein Assemblies in Crystals, In *Computational Life Sciences: First International Symposium, CompLife 2005, Konstanz, Germany, September 25-27, 2005. Proceedings* (R. Berthold, M., Glen, R. C., Diederichs, K., Kohlbacher, O., and Fischer, I., Eds.), pp 163-174, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- [98] Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I., and Metoz, F. (1999) ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript, *Bioinformatics* 15, 305-308.
- [99] DeLano, W. L. (2002) The PyMOL Molecular Graphics System, <http://www.pymol.org>.
- [100] Reger, A. S., Carney, J. M., and Gulick, A. M. (2007) Biochemical and Crystallographic Analysis of Substrate Binding and Conformational Changes in Acetyl-CoA Synthetase, *Biochemistry* 46, 6536-6546.
- [101] Holt, A., and Palcic, M. (2006) A peroxidase-coupled continuous absorbance plate-reader assay for flavin monoamine oxidases, copper-containing amine oxidases and related enzymes, *Nat Protocols* 1, 2498 - 2505.
- [102] Scott, A. I. (2000) Biosynthesis: Aromatic Polyketides, Isoprenoids, Alkaloids. Topics in Current Chemistry. Vol. 209 Edited by Finian J. Leeper (University of Cambridge) and John C. Vederas (University of Alberta). Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York. 2000. viii+ 247 pp. \$159.00. ISBN 3-540-66573-0, *Journal of the American Chemical Society* 122, 11756-11756.
- [103] Wessig, P., Wawrzinek, R., Möllnitz, K., Feldbusch, E., and Schilde, U. (2011) A new class of fluorescent dyes based on 1, 3-benzodioxole and [1, 3]-dioxolo [4.5-f] benzodioxole, *Tetrahedron Letters* 52, 6192-6195.
- [104] Nielsen, T. K., Hildmann, C., Dickmanns, A., Schwienhorst, A., and Ficner, R. (2005) Crystal structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue, *Journal of molecular biology* 354, 107-120.
- [105] Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., and Schwede, T. (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information, *Nucleic acids research* 42, W252-258.
- [106] Somoza, J. R., Skene, R. J., Katz, B. A., Mol, C., Ho, J. D., Jennings, A. J., Luong, C., Arvai, A., Buggy, J. J., Chi, E., Tang, J., Sang, B.-C., Verner, E., Wynands, R., Leahy, E. M., Dougan, D. R., Snell, G., Navre, M., Knuth, M. W., Swanson, R. V., McRee, D. E., and Tari, L. W. (2004) Structural Snapshots of Human HDAC8 Provide Insights into the Class I Histone Deacetylases, *Structure* 12, 1325-1334.
- [107] Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of Macromolecular Assemblies from Crystalline State, *Journal of molecular biology* 372, 774-797.
- [108] Gantt, S. L., Joseph, C. G., and Fierke, C. A. (2010) Activation and inhibition of histone deacetylase 8 by monovalent cations, *The Journal of biological chemistry* 285, 6036-6043.
- [109] Moreth, K., Riester, D., Hildmann, C., Hempel, R., Wegener, D., Schober, A., and Schwienhorst, A. (2007) An active site tyrosine residue is essential for amidohydrolase but not for esterase activity of a class 2 histone deacetylase-like bacterial enzyme, *The Biochemical journal* 401, 659-665.
- [110] Hildmann, C., Riester, D., and Schwienhorst, A. (2007) Histone deacetylases--an important class of cellular regulators with a variety of functions, *Applied microbiology and biotechnology* 75, 487-497.
- [111] Briquet, L., Vercauteren, D. P., Perpète, E. A., and Jacquemin, D. (2006) Is solvated trans-azobenzene twisted or planar?, *Chemical physics letters* 417, 190-195.
- [112] Weston, C. E., Kramer, A., Colin, F., Yildiz, O., Baud, M. G., Meyer-Almes, F. J., and Fuchter, M. J. (2016) Toward Photopharmacological Antimicrobial Chemotherapy Using Photoswitchable Amidohydrolase Inhibitors, *ACS Infect Dis*.

- [113] Lombardi, P., Angell, H., Whittington, D., Flynn, E., Rajashankar, K., and Christianson, D. (2011) Structure of prokaryotic polyamine deacetylase reveals evolutionary functional relationships with eukaryotic histone deacetylases, *Biochemistry* 50, 1808 - 1817.
- [114] Henkes, L. M., Haus, P., Jager, F., Ludwig, J., and Meyer-Almes, F. J. (2012) Synthesis and biochemical analysis of 2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-dodecafluoro-N-hydroxy-octanediamides as inhibitors of human histone deacetylases, *Bioorganic & medicinal chemistry* 20, 985-995.
- [115] Weston, C. E., Krämer, A., Colin, F., Yildiz, Ö., Baud, M. G. J., Meyer-Almes, F.-J., and Fuchter, M. J. (2016) Toward Photopharmacological Antimicrobial Chemotherapy Using Photoswitchable Amidohydrolase Inhibitors, *ACS Infectious Diseases*.
- [116] Nielsen, T., Hildmann, C., Riester, D., Wegener, D., Schwienhorst, A., and Ficner, R. (2007) Complex structure of a bacterial class 2 histone deacetylase homologue with a trifluoromethylketone inhibitor, *Acta Crystallogr Sect F: Struct Biol Cryst Commun* 63, 270 - 273.
- [117] Ghebremariam, Y. T., Erlanson, D. A., and Cooke, J. P. (2014) A Novel and Potent Inhibitor of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase: A Modulator of Cardiovascular Nitric Oxide, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 348, 69-76.
- [118] Okazaki, S., Oishi, S., Mizuhara, T., Shimura, K., Murayama, H., Ohno, H., Matsuoka, M., and Fujii, N. (2015) Investigations of possible prodrug structures for 2-(2-mercaptophenyl)tetrahydropyrimidines: reductive conversion from anti-HIV agents with pyrimidobenzothiazine and isothiazolopyrimidine scaffolds, *Organic & biomolecular chemistry* 13, 4706-4713.
- [119] Kleinschek, A., Meyners, C., Digiorgio, E., Brancolini, C., and Meyer-Almes, F. J. (2016) Potent and Selective Non-hydroxamate Histone Deacetylase 8 Inhibitors, *ChemMedChem*.
- [120] Magis, C., Taly, J. F., Bussotti, G., Chang, J. M., Di Tommaso, P., Erb, I., Espinosa-Carrasco, J., and Notredame, C. (2014) T-Coffee: Tree-based consistency objective function for alignment evaluation, *Methods Mol Biol* 1079, 117-129.
- [121] Styczynski, M. P., Jensen, K. L., Rigoutsos, I., and Stephanopoulos, G. (2008) BLOSUM62 miscalculations improve search performance, *Nature biotechnology* 26, 274-275.
- [122] Kramer, A., Herzer, J., Overhage, J., and Meyer-Almes, F.-J. (2016) Substrate specificity and function of acetylpolyamine amidohydrolases from *Pseudomonas aeruginosa*, *BMC Biochemistry* 17, 4.
- [123] Limsuwun, K., and Jones, P. G. (2000) Spermidine Acetyltransferase Is Required To Prevent Spermidine Toxicity at Low Temperatures in *Escherichia coli*, *Journal of bacteriology* 182, 5373-5380.
- [124] Fukuchi, J., Kashiwagi, K., Takio, K., and Igarashi, K. (1994) Properties and structure of spermidine acetyltransferase in *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry* 269, 22581-22585.
- [125] Soufi, B., Soares, N. C., Ravikumar, V., and Macek, B. (2012) Proteomics reveals evidence of cross-talk between protein modifications in bacteria: focus on acetylation and phosphorylation, *Current opinion in microbiology* 15, 357-363.
- [126] Hu, L. I., Lima, B. P., and Wolfe, A. J. (2010) Bacterial protein acetylation: the dawning of a new age, *Molecular microbiology* 77, 15-21.
- [127] Jones, J. D., and O'Connor, C. D. (2011) Protein acetylation in prokaryotes, *Proteomics* 11, 3012-3022.
- [128] Ouidir, T., Cosette, P., Jouenne, T., and Hardouin, J. (2015) Proteomic profiling of lysine acetylation in *pseudomonas aeruginosa* reveals the diversity of acetylated proteins, *Proteomics*.
- [129] Drlica, K., and Rouviere-Yaniv, J. (1987) Histone-like proteins of bacteria, *Microbiological reviews* 51, 301-319.
- [130] Hildmann, C., Ninkovic, M., Dietrich, R., Wegener, D., Riester, D., Zimmermann, T., Birch, O. M., Bernegger, C., Loidl, P., and Schwienhorst, A. (2004) A new amidohydrolase from *Bordetella* or *Alcaligenes* strain FB188 with similarities to histone deacetylases, *Journal of bacteriology* 186, 2328-2339.
- [131] Zhang, Y., Li, N., Caron, C., Matthias, G., Hess, D., and Khochbin, S. (2003) HDAC-6 interacts with and deacetylates tubulin and microtubules in vivo, *The EMBO journal* 22, 1168 - 1179.

-
- [132] Sakurada, K., Ohta, T., Fujishiro, K., Hasegawa, M., and Aisaka, K. (1996) Acetylpolyamine amidohydrolase from *Mycoplana ramosa*: gene cloning and characterization of the metal-substituted enzyme, *Journal of bacteriology* 178, 5781-5786.
- [133] Winsor, G. L., Lam, D. K. W., Fleming, L., Lo, R., Whiteside, M. D., Yu, N. Y., Hancock, R. E. W., and Brinkman, F. S. L. (2011) Pseudomonas Genome Database: improved comparative analysis and population genomics capability for Pseudomonas genomes, *Nucleic acids research* 39, D596-D600.
- [134] Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D., and Ravikesavan, R. (2013) Gene duplication as a major force in evolution, *Journal of genetics* 92, 155-161.
- [135] Koonin, E. (2016) *Horizontal gene transfer: essentiality and evolvability in prokaryotes, and roles in evolutionary transitions [version 1; referees: 2 approved]*, Vol. 5.
- [136] Molin, S., and Tolker-Nielsen, T. (2003) Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure, *Current Opinion in Biotechnology* 14, 255-261.
- [137] Fisher, S. J., Blakeley, M. P., Ciani, M., McSweeney, S., and Helliwell, J. R. (2012) Protonation-state determination in proteins using high-resolution X-ray crystallography: effects of resolution and completeness, *Acta Crystallographica Section D* 68, 800-809.
- [138] Hai, Y., and Christianson, D. W. (2016) Histone deacetylase 6 structure and molecular basis of catalysis and inhibition, *Nat Chem Biol* 12, 741-747.
- [139] Beher, D., Wu, J., Cumine, S., Kim, K. W., Lu, S. C., Atangan, L., and Wang, M. (2009) Resveratrol is not a direct activator of SIRT1 enzyme activity, *Chemical biology & drug design* 74, 619-624.

8. ANHANG

8.1. Optimierte Feinscreens für Protein Kristallzucht

Tabelle 23: Phosphat-Feinscreen für PA3774 und Mutanten.

		1 M µl	2 M µl	3 M µl	4 M µl	5 M µl	6 M µl
	Lösung						
A	(NH ₄) ₂ SO ₄	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0
	P-MM	0,5 333	0,471 333	0,446 333	0,423 333	0,403 333	0,384 333
	MilliQ	167	197	227	257	287	317
B	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,033 8	0,031 8	0,03 8	0,028 8	0,027 8	0,026 8
	P-MM	0,5 333	0,471 333	0,446 333	0,423 333	0,403 333	0,384 333
	MilliQ	159	189	219	249	279	309
C	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,066 17	0,062 17	0,059 17	0,056 17	0,053 17	0,051 17
	P-MM	0,5 333	0,471 333	0,446 333	0,423 333	0,403 333	0,384 333
	MilliQ	151	181	211	241	271	301
D	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,1 25	0,094 25	0,089 25	0,085 25	0,081 25	0,077 25
	P-MM	0,5 333	0,471 333	0,446 333	0,423 333	0,403 333	0,384 333
	MilliQ	142	172	202	232	262	292

Gesamtmenge	500	530	560	590	620	650
-------------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

Stammlösungen: 2 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
 0,75 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ (P-Master Mix) pH 7,5

Tabelle 24: PEG400-Feinscreen für FB188-HDAH.

	Lösung	1 μl	2 μl	3 μl	4 μl	5 μl	6 μl
A	PEG400	0,5 % 2,5	1 % 5	1,5 % 7,5	2 % 10	2,5 % 12,5	3 % 15
	M-I-P	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100
	MilliQ	397,5	395	392,5	390	387,5	385
B	PEG400	3,5 % 17,5	4 % 20	4,5 % 22,5	5 % 25	5,5 % 27,5	6 % 30
	M-I-P	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100
	MilliQ	382,5	380	377,5	375	372,5	370
C	PEG400	6,5 % 32,5	7 % 35	7,5 % 37,5	8 % 40	8,5 % 42,5	9 % 45
	M-I-P	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100
	MilliQ	367,5	365	362,5	360	357,5	355
D	PEG400	9,5 % 47,5	10,5 % 52,5	11,5 % 57,5	12,5 % 62,5	13,5 % 67,5	14,5 % 72,5
	M-I-P	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100	0,1 M 100
	MilliQ	352,5	347,5	342,5	337,5	332,5	327,5

Stammlösungen:	100 %	PEG400
	0,5 M	Malat-Imidazol-Puffer (M-I-P) pH 5,25

Tabelle 25: PEG4000-Feinscreen für FB188-HDAH.

	Lösung	1 μl		2 μl		3 μl		4 μl		5 μl		6 μl	
A	PEG4000	14,5 %	145	15 %	150	15,5 %	155	16 %	160	16,5 %	165	17 %	170
	M-I-P	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100
	MilliQ		255		250		245		240		235		230
B	PEG4000	17,5 %	175	18,5 %	185	19,5 %	195	20,5 %	205	21,5 %	215	22,5 %	225
	M-I-P	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100
	MilliQ		225		215		205		195		185		175
C	PEG4000	23 %	230	23,5 %	235	24 %	240	24,5 %	245	25 %	250	25,5 %	255
	M-I-P	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100
	MilliQ		170		165		160		155		150		145
D	PEG4000	26 %	260	26,5 %	265	27 %	270	27,5 %	275	28 %	280	28,5 %	285
	M-I-P	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100	0,1 M	100
	MilliQ		140		135		130		125		120		115

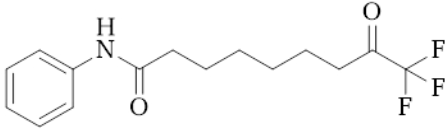
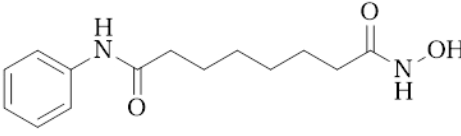
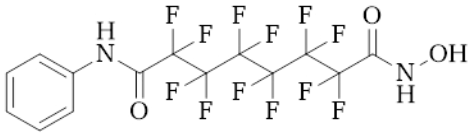
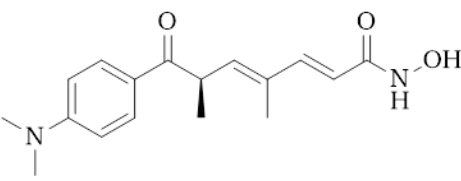
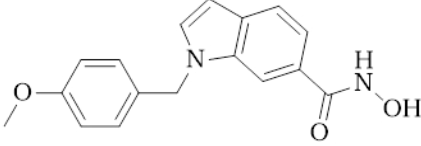
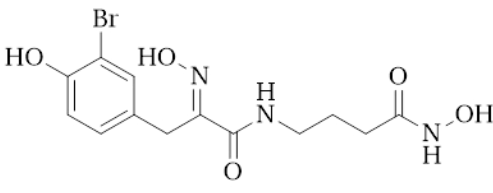
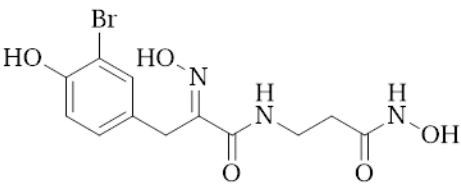
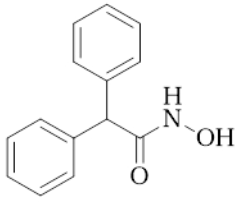
Stammlösungen: 50 % PEG4000
 0,5 M Malat-Imidazol-Puffer pH 7

Tabelle 26: Phosphat-Feinscreen für FB188-HDAH.

	Lösung	1 μl		2 μl		3 μl		4 μl		5 μl		6 μl	
A	Na-Ac	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25
	P-MM	1,05 M	263	1,1 M	275	1,15 M	287	1,2 M	300	1,25 M	313	1,3 M	325
	Butandiol	5 %	25	5 %	5	5 %	25	5 %	25	5 %	25	5 %	25
	MilliQ		187		195		163		150		137		125
B	Na-Ac	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25
	P-MM	1,35 M	334	1,4 M	350	1,45 M	363	1,5 M	375	1,55 M	387	1,6 M	400
	Butandiol	5 %	25	5 %	5	5 %	25	5 %	25	5 %	25	5 %	25
	MilliQ		116		120		87		75		63		50
C	Na-Ac	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25
	P-MM	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325
	Butandiol	0 %	0	1 %	5	2 %	10	3 %	15	4 %	20	5 %	25
	MilliQ		150		145		140		135		130		125
D	Na-Ac	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25	0,05 M	25
	P-MM	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325	1,3 M	325
	Butandiol	6 %	30	7 %	35	8 %	40	9 %	45	10 %	50	11 %	55
	MilliQ		120		115		110		105		100		95

Stammlösungen: 100 % 1,4-Butandiol
 2 M 1,3 M Natrium/Kaliumphosphate (P-MM) pH 5,5
 1 M Natriumacetate

8.2. Inhibitoren

Struktur	Trivialname	Masse (g/mol)
	SATFMK	301,3
	SAHA	264,3
	PFSAHA	480,2
	TSA	302,4
	PCI-34051	296,3
	MB275	374,2
	MB265	360,2
	PDF299	227,3

8.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Histon-Oktamer mit gebundener DNA.....	2
Abbildung 2: Vergleich verschiedener HDAC-Isoenzyme.....	3
Abbildung 3: Vorgeschlagene Mechanismen für HDACs der Klassen I, IIb und IV.	4
Abbildung 4: Strukturen der vier häufigsten biogenen Polyamine.	5
Abbildung 5: Aufnahmen von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6
Abbildung 6: Schematische Darstellung einer Photoisomerisierung.	7
Abbildung 7: Vergleich zwischen herkömmlicher und photoinduzierter Chemotherapie.	8
Abbildung 8: Als Wirkstoff gegen Krebserkrankungen zugelassene HDAC-Inhibitoren.	9
Abbildung 9: Photoschaltbare Inhibitoren.	9
Abbildung 10: Kristallisationsgrundlagen.	12
Abbildung 11: Grundlagen Röntgenbeugung.....	14
Abbildung 12: Schematisches Prinzip einer CPD Reinigung.....	31
Abbildung 13: Reaktionsabfolge des AMC-Assays.....	35
Abbildung 14: Reaktionsabfolge des Diaminoxidase-Assays.....	37
Abbildung 15: Reaktionsabfolge des Acetat-Assays.....	39
Abbildung 16: Präparatives Agarose-Gel der Umklonierung des Gens <i>pa0321</i>	44
Abbildung 17: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA3774.....	47
Abbildung 18: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA3774.....	48
Abbildung 19: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA0321.....	49
Abbildung 20: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA0321.....	49
Abbildung 21: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie von PA1409.....	50
Abbildung 22: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie von PA1409.....	50
Abbildung 23: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie der FB188-HDAH..	51
Abbildung 24: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie der FB188-HDAH.....	51
Abbildung 25: Chromatogramm und SDS-PAGE der Affinitätschromatographie der ACS.	53
Abbildung 26: Chromatogramm und SDS-PAGE der Größenausschlusschromatographie der ACS.....	53
Abbildung 27: Michaelis-Menten-Bestimmung durch AMC-Assay.....	55
Abbildung 28: Michaelis-Menten-Kinetik bestimmt durch den Diaminoxidase Assay.....	56
Abbildung 29: Ergebnisse des Acetat-Assays.....	57
Abbildung 30: Vergleich zwischen Inhibitoren und Referenzsubstanzen.....	58
Abbildung 31: Dosis-Wirkungskurven der Arylazopyrazol-Substanzen auf bakterielle HDACs..	59
Abbildung 32: Dosis-Wirkungskurven der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDACs.....	61
Abbildung 33: Dosis-Wirkungskurven der Azobenzol-Derivate sowie ihren zugehörigen Stilben-Referenzen auf PA1409.....	63
Abbildung 34: Dosis-Wirkungskurven der Azobenzol-Derivate mit zugehörigen Stilben-Referenzen auf menschliche HDACs.	65
Abbildung 35: Design der DBD-Sonde.....	66
Abbildung 36: Bestimmung der FLT-Parameter..	67
Abbildung 37: Dosis Wirkungskurven des FLT- Kompetitions-Assays mit ausgewählten Inhibitoren.	68
Abbildung 38: Initial erhaltene Kristalle..	69
Abbildung 39: Verschiedene Kristallformen von PA3774 im Vergleich.....	70
Abbildung 40: FB188-HDAH-Kristalle aus verschiedenen Bedingungen im Vergleich.	72
Abbildung 41: Mit Inhibitoren inkubierte FB188-HDAH-Kristalle.	72
Abbildung 42: ASU des Enzyms PA3774.....	79
Abbildung 43: Einheitszelle des tetragonalen PA3774-Kristalls.....	80
Abbildung 44: PA3774-Tetramer..	81
Abbildung 45: Bindetasche von PA3774.....	82
Abbildung 46: Detailansicht der Metallbindestellen.	83
Abbildung 47: Stereobild der nativen PA3774-Struktur..	84
Abbildung 48: PA3774-SATFMK-Komplex.	85
Abbildung 49: PA3774-CEW395-Komplex.	87
Abbildung 50: Stereobild des PA3774-Acetat-Komplexes.	87
Abbildung 51: PA3774-Mutanten.....	88
Abbildung 52: PA3774 _{Y313F} -PFSAHA-Komplex.....	89
Abbildung 53: Struktur der FB188-HDAH.....	90
Abbildung 54: FB188-HDAH-PFSAHA-Komplex.....	92

Abbildung 55: FB188-HDAH _{T101A} -SATFMK-Komplex.	93
Abbildung 56: Bindung der photoschaltbaren Inhibitoren an das Enzym FB188-HDAH.	95
Abbildung 57: FB188-HDAH-PD 404,182-Komplex.	96
Abbildung 58: Überlagerung zweier HDAH-Strukturen im ungebunden und gebunden Zustand.....	97
Abbildung 59: PA3774 nativ und bei Ligandenbindung.....	98
Abbildung 60: Sequenzvergleich..	99

8.4. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ablaufprotokoll der Hitzeschock-Transformation.....	28
Tabelle 2: Zusammensetzung der Quick Change und Thermocycler Programm.	28
Tabelle 3: Ultraschallaufschluss.	30
Tabelle 4: Protokoll der Nickel Affinitätschromatographie.	32
Tabelle 5: Zusammensetzung des BCA-Assay-Lösungen A und B.	33
Tabelle 6: Zusammensetzung des Polyacrylamidgels.	34
Tabelle 7: Relative Aktivitäten der PA3774-Mutanten.....	46
Tabelle 8: Michaelis-Menten-Parameter bestimmt durch AMC-Assay.	54
Tabelle 9: Michaelis-Menten-Parameter bestimmt durch Diaminoxidase-Assay.	56
Tabelle 10: Spezifische Aktivität bestimmt durch Acetat-Assay.	57
Tabelle 11: Ermittelte IC ₅₀ -Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf bakterielle HDAC-Enzyme in µM.	59
Tabelle 12: Ermittelte IC ₅₀ Werte der Arylazopyrazol-Derivate auf menschliche HDAC-Enzyme in µM.....	60
Tabelle 13: Ermittelte IC ₅₀ -Werte der Azobenzol-Derivate auf bakterielle HDAC-Enzyme in µM.	62
Tabelle 14: Ermittelte IC ₅₀ Werte der Azobenzol-Derivate auf menschliche HDACs in µM.	64
Tabelle 15: Bestimmte FLT-Parameter.	67
Tabelle 16: Vergleich der K _f -Werte aus FLT-Assay und AMC-Assay.....	68
Tabelle 17: Erfolgreiche Bedingungen aus den Initial-Screens.....	69
Tabelle 18: Ausgangsbedingungen für die Kristallisation des Enzyms FB188-HDAH.....	71
Tabelle 19: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der aufgeklärten PA3774-Strukturen.....	74
Tabelle 20: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der aufgeklärten PA3774-Mutanten-Strukturen.	75
Tabelle 21: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der FB188-HDAH-Liganden-Komplexe.	77
Tabelle 22: Statistik der Datensammlung und Verfeinerung der FB188-HDAH-Liganden-Komplexe.	78
Tabelle 23: Phosphat-Feinscreen für PA3774 und Mutanten.	123
Tabelle 24: PEG400-Feinscreen für FB188-HDAH.....	123
Tabelle 25: PEG4000-Feinscreen für FB188-HDAH.....	124
Tabelle 26: Phosphat-Feinscreen für FB188-HDAH.....	124

8.5. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
Å	Angström
Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
ACS	Acetyl-CoA-Synthetase
ADP	Adenosindiphosphat
AMC	7-Amino-4-Methylcoumarin
APAH	Acetylpolyamin Aminohydrolase
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
ASU	asymetrische Einheit
ATP	Adenosintriphosphat
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Bspw.	Beispielsweise
CoA	Coenzym A
CPD	Cystein Protease Domäne
CS	Citrat-Synthase
Da	Dalton
DBD	[1,3]dioxolo[4,5-f][1,3]benzodioxol
ddNTP	2',3'-Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FLT	Fluoreszenz Lebensdauer (<i>fluorescence lifetime</i>)
FP	<i>Forward</i> -Primer
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
GPC	Gel-Permeations-Chromatographie
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDAH	Histondeacetylase-ähnliche Amidohydrolase
HDLP	Histondeacetylase-ähnliches Protein
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
His-Tag	Polyhistidin-Tag
HTS	Hochdurchsatzscreening (<i>High Throughput Screening</i>)
h ν	Energie eines Photons
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Unimolekulare /einphasige Ratenkonstante
K	Kelvin
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
mAU	Milliabsorptionseinheiten
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MD	Molekulardynamik
MSA	multiple sequence alignment
MWCO	Molecular weight cut off
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid

ns	Nanosekunde
OD	Optische Dichte
<i>P. a.</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB ID	Proteindatenbank-Identifikationscode
PEG	Polyethylenglycol
PFSAHA	<i>2,2,3,3,4,4,5,5,6,6,7,7-dodecafluoro-N1-hydroxy-N8-phenyloctanedi- amide</i>
QM	Quanten Mechanik
ppm	<i>parts per million</i>
PSS	Photostationärer Zustand
RFU	Relative Fluoreszenzintensität
RMSD	<i>Root-mean-square-deviation</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Reverse-Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SAHA	Suberoylanilid Hydroxamsäure
SATFMK	<i>9,9,9-trifluoro-8-oxo-N-phenyl-nonanamide</i>
SD	<i>Standard deviation</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Tab.	Tabelle
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
vgl.	verglichen
VIS	Visuell
Wt	Wildtyp
Z`-	Standardisierung oder z-Transformation
Δ	Temperaturänderung
λ	Wellenlänge

9. DANKSAGUNG

Nach Jahren intensiver Arbeit ist es an der Zeit mich bei all den Menschen zu bedanken, die mir diese Promotion ermöglichten und mich bei deren Anfertigung auf allen Ebenen unterstützt haben.

Großer Dank gilt natürlich Herrn Prof. Dr. Franz-Josef Meyer-Almes, für die Bereitstellung des interessanten Themas, dem entgegengebrachten Vertrauen und der reibungslosen alltäglichen Zusammenarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Harald Kolmar bedanken, mir die Möglichkeit der Promotion überhaupt erst zu eröffnen sowie die Übernahme des Referates.

Ohne die hervorragende Zusammenarbeit mit engagierten Kooperationspartnern wären viele Ergebnisse dieser Arbeit sowie Publikationen nicht zustande gekommen, weshalb den folgenden Personen und Institutionen mein größter Dank gilt:

Dr. Özkan Yildiz, Dr. Javier Carrera-Casanova und Katharina van Pee vom MPI in Frankfurt am Main.

Dr. Jörg Overhage und Jan Herzer vom KIT.

Dr. Matthew J. Fuchter und Dr. Claire E. Weston vom Imperial College in London

Dr. Ralf Bischoff vom DKFZ in Heidelberg.

Dr. Elmar Jaenicke von der Universität Mainz.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Hans Lothar Fuchsbauer für die stets anregenden Gespräche während den Mittagspausen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei Frau Janina Fengel für die Bereitstellung eines sechsmonatigen Promotionsstipendiums bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Meyer-Almes und Fuchsbauer für das freundliche und unkomplizierte Arbeitsklima und besonders bei den Laboringenieuren Michael Schröder und Ulrike Becher, meinen Doktorandenkollegen Stephan Zindel, Michael Korbus, Benjamin Horstmann, Christian Meyners, Alexander Kleinschek, David Fiebig, Norbert Jüttner, Benjamin Wolff und Anita Anderl sowie meinem Bacheloranden Steffen Hinz, Patrick Streb, Katharina Knobloch, Thomas Wagner und Felix Colin bedanken.

Ein obligatorisches Dankeschön zum Abschluss gehört meiner Familie und meinen engen Freunden, die mich immer unterstützt und auf meinem Weg begleitet haben.

10. ERKLÄRUNGEN


Andreas Krämer
Stauffenbergstrasse 62
64283 Darmstadt

Darmstadt, den 13. Februar 2017

Erklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich meine Dissertation selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

(Andreas Krämer)



Andreas Krämer
Stauffenbergstrasse 62
64283 Darmstadt

Darmstadt, den 13. Februar 2017

Erklärung

Ich erkläre hiermit, noch keinen Promotionsversuch unternommen zu haben.

(Andreas Krämer)

11. LEBENSLAUF

PERSÖNLICHE ANGABEN

Name: Andreas Krämer
Geburtsdaten: 11. März 1984 in Baden-Baden

PROMOTION

Seit 04/2013 **Promotion zum Dr. rer. nat., FB Biochemie, TU Darmstadt**
Dr. Vater: Prof. H. Kolmar, Betreuer: Prof. F.J. Meyer-Almes
Dissertation:

- „Strukturelle Untersuchung Histon-Deacetylase-ähnlicher Enzyme aus *Pseudomonas aeruginosa*“

STUDIUM

03/2011 – 01/2012 **Diplomarbeit, FB Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg**
Betreuer: Prof. O. Einsle
Themen:

- „Aktivitätsmessung der Nitrogenase aus *A. vinelandii*“
- „Kristallisation der 4-Hydroxyphenylpyruvat-Dioxygenase aus *P. torridus*“

07/2007 – 01/2012 Hauptstudium, Chemie

10/2004 – 07/2007 Grundstudium, Chemie

SCHULBILDUNG

09/2001 – 07/2004 **Technisches Gymnasium, Rastatt**

09/1995 – 06/2001 **Realschule, Gernsbach**

09/1991 – 01/1995 **Grundschule, Forbach**

(Andreas Krämer)